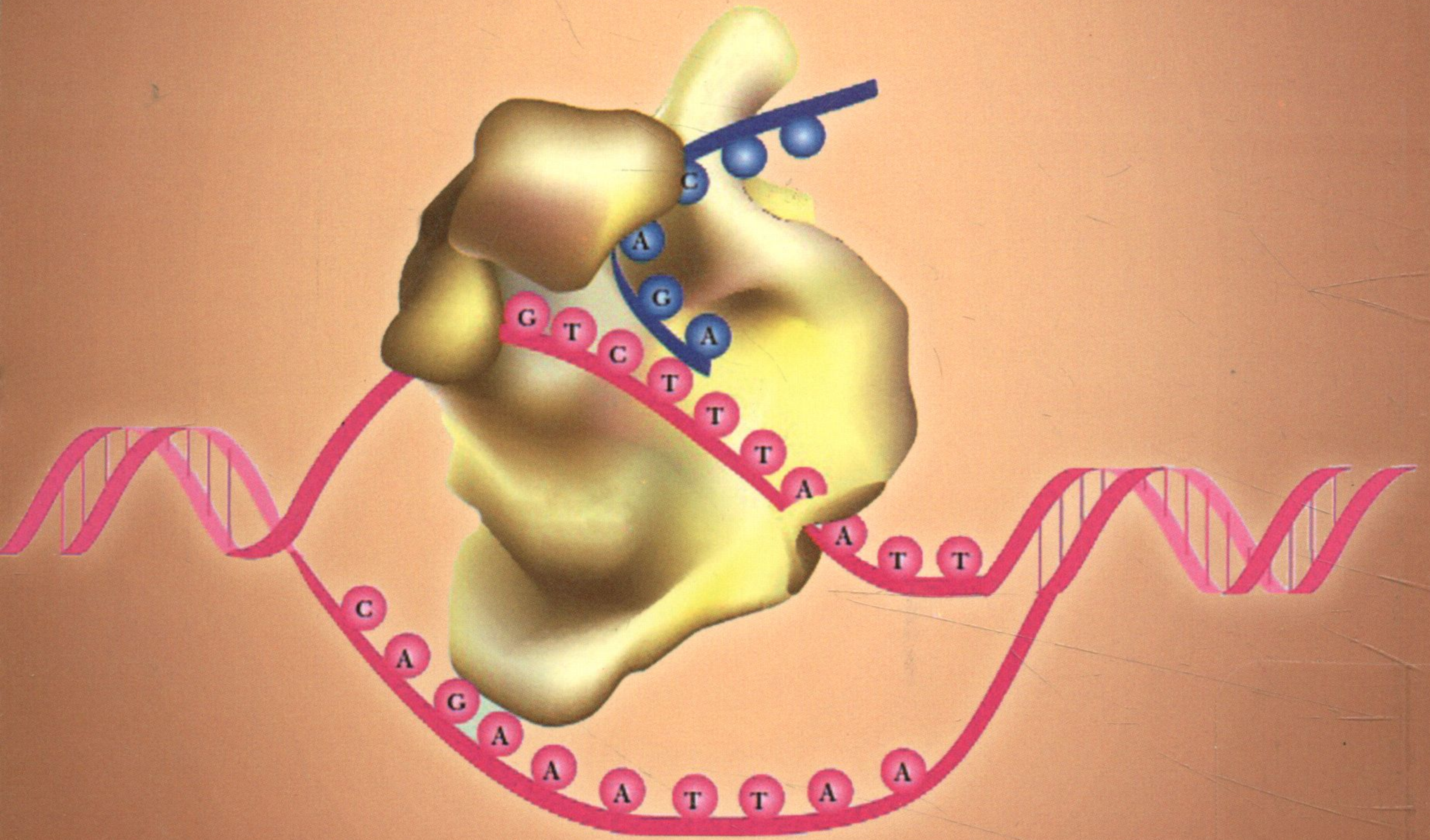


مدخل في

الجينات والهندسة الوراثية

*Introduction to
Genes and Genetic Engineering*



إعداد

الأستاذ الدكتور

محمد محمد عبد الفتاح ياقوت

أستاذ الوراثة والبيوتكنولوجيا

الأستاذ الدكتور

منير السعيد محمد موسى

أستاذ الوراثة الجزيئية

كلية الزراعة - جامعة الاسكندرية

مدخل فى
الجينات والهندسة الوراثية

*Introduction to
Genes and Genetic Engineering*

إعداد

الأستاذ الدكتور
محمد محمد عبد الفتاح ياقوت
أستاذ الوراثة والبيوتكنولوجيا

الأستاذ الدكتور
هنير السعيد محمد موسى
أستاذ الوراثة الجزيئية

كلية الزراعة - جامعة الاسكندرية

اسم الكتاب : مدخل فى الجينات والهندسة الوراثية

المؤلفين : منير السعيد محمد موسى - محمد محمد عبد الفتاح ياقوت

الطبعة الاولى: 2014

رقم الايداع : 15821 / 2013

الترقيم الدولى : 4 - 137 - 393 - 977 - 978 I.S.B.N.

الناشر

مكتبة بستان المعرفة

ج. م. ع - كفر الدوار - الحدائق - ش سور المصنع أمام أبراج الحلوانى

☎ 045/2202659 & الإسكندرية 0121151237

E-mail: bostan_elma3rafa@yahoo.com

الطباعة والتجهيزات الفنية:

منشأة الشنهاى للطباعة والنشر

E-mail: shenhapy@yahoo.com

جميع حقوق النشر محفوظة للمؤلفين

ولا يجوز طبع أو نشر أو تصوير أو إنتاج هذا المصنف

أو أى جزء منه بأية صورة من الصور

بدون تصريح كتابى مسبق ومن يخالف ذلك يتعرض

للمساءلة القانونية المنصوص عليها فى القانون المصرى

تمهيد

في الثلاثين سنة الأخيرة من القرن العشرين حدثت ثورة علمية هائلة في طرق التقنية الحيوية الحديثة التي تمثلت في التحسين الهائل لطرق التعامل مع المادة الوراثية (DNA) عملياً وتطبيق هذه الطرق في مجال الوراثة الجزيئية والذي يعرف بالهندسة الوراثية.

ولقد أصبح من المؤكد نجاح استخدام طرق التقنية الحيوية الحديثة في إنتاج أصناف نباتية معدلة جينياً وخاصة تلك المقاومة وراثياً لبعض مبيدات الحشائش الكيميائية وكذلك مقاومة وراثياً لبعض الآفات الحشرية. والأكثر من ذلك أمكن هندسة البكتيريا جينياً واستخدامها كمصانع بيولوجية لإنتاج بعض هرمونات الإنسان مثل هرمون الإنسولين والسوماتوستاتين والسوماتوتروبين وكذلك إنتاج حيوانات معدلة جينياً كما امتد هذا التطبيق لهندسة الجينات أو الهندسة الوراثية في مجال العلاج الجيني لبعض الأمراض الوراثية في الإنسان.

لذلك فإننا نقدم هذا الكتاب إلى المكتبة العربية يحدونا الأمل في أن يكون إضافة معرفية في مجال الجينات والهندسة الوراثية. ولقد وضعت أبواب هذا الكتاب في ترتيب متناسق ومتكامل حيث تضمنت أبوابه الجينات وطبيعة تركيبها وتعبيرها وتنظيم تعبيرها الجيني في كل من الكائنات غير حقيقية النواة و الكائنات حقيقية النواة كما تضمن هذا الكتاب باب مستقل عن أساسيات وطرق الهندسة الوراثية للجينات وكذلك باب مستقل عن النباتات المعدلة جينياً بالهندسة الوراثية وباب مستقل عن العلاج الجيني وباب مستقل عن البيولوجيا الجزيئية للسرطان وفي النهاية باب عن التكاثر الكلوني في الحيوانات.

ولقد راعينا في هذا الكتاب الاحتفاظ بالمصطلحات الأجنبية مع تعريبها حرفياً حتى لا يجهد القارئ نفسه ويزيد من تركيزه في فهم الموضوعات المتنوعة.

ونسأل الله تعالى أن يسدد خطانا ويجزل لنا الثواب يوم المآب راجين منه أن يصل عملنا هذا خالصاً لوجهه الكريم ونرجو ممن قرأ فيه فاستفاد أن يخصنا بدعوة صالحة تنفعنا يوم الميعاد وصلى الله على سيدنا محمد وآله وصحبه وسلم تسليماً كثيراً.

المحتويات

تمهيد

الفهرس

1	الباب الاول: الطبيعة الكيميائية للجينات	Chemical Nature of Genes or DNA
1	مقدمة تاريخية	
3	أولاً: الخصائص الكيميائية لموقع الـDNA بالكروموسومات	
4	ثانياً: التجارب التي أجريت لتحديد الـDNA هو المادة الوراثية	
4	التحول الوراثي البكتيري	
9	دراسة المادة الوراثية المسئولة عن تكاثر البكتيريوفاج	
11	ثالثاً: النموذج البنائي لجزيئى الـDNA	
11	التركيب الكيميائى للـDNA	
14	الـDNA يحمل المعلومات الوراثية	
16	نموذج الحلزون المزدوج لبناء جزيء الـDNA	
16	دراسة جزيئات الـDNA بواسطة الأشعة السينية X-rays	
17	التحليل الكيميائى لجزيئات الـDNA من مصادر مختلفة	
21	رابعاً: تضاعف الـDNA	
26	آلية تضاعف الـDNA	
29	أولاً: آلية التضاعف المستمر أحادي الإتجاه	
31	ثانياً: آلية التضاعف نصف المتقطع أحادي الإتجاه	
33	ثالثاً: آلية التضاعف نصف المتقطع ثنائى الإتجاه	
35	رابعاً: آلية التضاعف المستمر ثنائى الإتجاه	
39	الباب الثانى: الجينات	The Genes
39	مفهوم الجين	
42	التركيب الدقيق للجين	
44	السسترون	
47	الريكون	
48	الميتون	
50	التعريف الدقيق للجين	
50	تركيب الجين فى الكائنات حقيقية النواة	
53	التصميم العام للجينات التى تحمل شفرات البروتين فى الكائنات حقيقية النواة	
55	طرز الجينات	
56	أولاً: نسخ طرز الجينات المختلفة فى الكائنات غير حقيقية النواة	

57	ثانياً: : نسخ طرز الجينات المختلفة فى الكائنات حقيقية النواة
57	إنزيم البلمره (pol I)
58	إنزيم البلمره (pol II)
59	إنزيم البلمره (pol III)
61	التركيب العام لإنزيمات بلمرة الـ RNA فى الكائنات حقيقية النواة
62	العائلات الجينية
66	الجينات الكاذبة
67	للترانسبوزونات
68	الساقليات DNA
69	المينى ساقليات DNA
69	تنظيم الجينوم
69	قيمة الـ C-Value

الباب الثالث: الشفرة الوراثية والتخليق الحيوى للبروتين

71	The Genetic Code and Protein Biosynthesis
71	أولاً: الشفرة الوراثية
72	تعيين وتحديد الشفرة الوراثية
77	مرادفات الشفرة الوراثية
79	عمومية الشفرة الوراثية
79	أنواع الطفرات التى تحدث فى الشفرة الوراثية
81	تطور الشفرة الوراثية
81	ثانياً: التخليق الحيوى للبروتين
83	أولاً: نسخ الجين
85	ثانياً: ترجمة الـ mRNA

الباب الرابع: الطبيعة الكيميائية للتعبير الجينى

89	Chemical Nature of Gene Expression
89	أولاً: النسخ
91	مرحلة البداية
91	مرحلة الإطالة
92	مرحلة الانتهاء
93	ثانياً: الترجمة
95	مرحلة البداية
96	مرحلة الإطالة
99	مرحلة الانتهاء
99	عديد الريبوسومات

103	الباب الخامس:تنظيم التعبير الجينى فى الكائنات غير حقيقية النواة Regulation of Gene Expression in Prokaryotes
104	الآليات الوراثية فى الكائنات غير حقيقية النواة استجابة للظروف البيئية
106	أولاً: النظام التحفيزى
107	الجينات التركيبية
108	نموذج الاوبرون : التحكم السالب
109	عزل الكابت
112	ثانياً: النظام الكبتى
115	الباب السادس:تنظيم التعبير الجينى فى الكائنات حقيقية النواة Regulation of Gene Expression in Eukaryotes
118	أولاً: تنظيم التعبير الجينى عند مستوى النسخ
118	البروموتور
119	عناصر البروموتور الأدنى
124	المعززات
126	السينسرسز
126	العازلات
128	تنظيم نسخ الجين بواسطة هرمون الثيرويد
129	دور البروتينات ميك Myc وماكس Max فى نسخ الجين
135	دور الكروماتين فى تنظيم التعبير الجينى
141	ثانياً: تنظيم التعبير الجينى عند مستوى ما بعد النسخ
141	الـ RNA الدقيق miRNAs
143	الـ RNA مضاد المعنى
143	البروتينات التى ترتبط بالمناطق التى لا تترجم من الـ mRNA فى الطرف 3'
145	الوصل البديل
145	افساد الـ mRNA
147	ثالثاً: تنظيم التعبير الجينى عند مستوى الترجمة
147	عملية الفسفرة
148	تنظيم الترجمة عن طريق البروتين نانوس
150	رابعاً: تنظيم التعبير الجينى ما بعد الترجمة
150	تحويل البروتين
150	تكسير البروتين
151	مقارنة بين تنظيم التعبير الجينى فى البكتريا والكائنات حقيقية النواة

153	Genetic Engineering	الباب السابع: الهندسة الوراثية
155		أولاً: عزل الـ DNA
155		ثانياً: تجزئة أو تقطيع الـ DNA الى قطع صغيرة
161		ثالثاً: وصل قطع الـ DNA أو الجين المنقول بالحامل المناسب
161		رابعاً: كلونة الجين المنقول
162		وصل قطع الـ DNA
168		إنتخاب البلازميد المعاد توليفه
168		طريقة التحول البكتيري
170		كلونة البكتيريا بجينات الكائنات حقيقية النواة
170		أولاً: طريقة الـ c-DNA
174		ثانياً: طريقة الجينات المخلقة صناعياً
175		إنشاء مكتبة الجينات
176		مكتبات التعبير الجيني للكائنات حقيقية النواة
177		خصائص حوامل التعبير الجيني
181	Transgenic Plants	الباب الثامن: النباتات المعدلة جينياً
181		نظرة تاريخية لتربية النبات
184		الوسائل المستخدمة في تكنولوجيا الـ DNA المعاد توليفه
184		أولاً: زراعة الأنسجة النباتية
185		طريقة زراعة الكالس
186		طريقة المعلق
189		ثانياً: إدخال الجينات في النباتات باستعمال البلازميد Ti-plasmid
189		أ - الطبيعة البيولوجية للبكتيريا أجروباكتيريوم
189		ب- الطبيعة الكيميائية للـ Ti-plasmid
194		ج- استخدام البلازميد Ti-plasmid في إدخال الجين المنقول
195		د- إنتاج نباتات معدلة جينياً بواسطة البلازميد المعاد توليفه
198		ثالثاً: تكنولوجيا أداة القنف
200		اكتشاف الجين المنقول
201		استئصال الجين المخبر
207		تربية النباتات المعدلة جينياً وإختبارها
210		النباتات المعدلة جينياً والمقاومة لمبيد الحشائش
214		النباتات المعدلة جينياً والمقاومة للحشرات
217		النباتات المعدلة جينياً التي تتحمل الظروف البيئية القاسية
218		نباتات الأرز المعدلة جينياً

219	إنتاج نباتات معدلة جينياً مقاومة للإصابة الفيروسية
221	إنتاج العقاقير الطبية بواسطة النباتات المعدلة جينياً
223	المعالجة النباتية للملوثات والاستخدامات الأخرى للنباتات المعدلة وراثياً
224	الغطاء النباتي الأرضي
224	استخلاص الملوثات من التربة
225	المركب السام Bt والفراشات
227	الباب التاسع: الحيوانات المعدلة جينياً Transgenic Animals (T.G.A.)
228	تخليق الحيوانات المعدلة جينياً
231	الفئران المعدلة جينياً
232	إنتاج بعض البروتينات بواسطة الأبقار المعدلة جينياً
233	الماعز المعدلة جينياً
234	الطرق البديلة لإنتاج حيوانات معدلة جينياً
236	تأثير الموقع على التعبير الجيني للجين المنقول
239	التحكم المتعمد في التعبير الجيني للجين المنقول
239	أولاً: بروتون العائل التحفيزي
240	ثانياً: نظم البروتون المعاد توليفه
243	ثالثاً: تنظيم التعبير الجيني للجين المنقول عن طريق مستقبلات هرمون الاسترويد
246	الحشرات المعدلة جينياً
248	إنتاج أغنام معدلة جينياً
250	إنتاج أبقار معدلة جينياً
251	الدواجن المعدلة جينياً
253	مخاطر الدواجن المعدلة جينياً
253	استنساخ ذكور الفئران من خلايا قمة الذيل البالغة
257	الباب العاشر: هندسة جينات الكائنات حقيقية النواة في البكتيريا Engineering Eukaryotic Genes In Bacteria
261	أولاً: البكتيريا المكونة بجين هرمون السوماتوستاتين
263	ثانياً: البكتيريا المكونة بجين هرمون السوماتوتروبين
264	ثالثاً: البكتيريا المكونة بجين هرمون الأنسولين
269	الباب الحادي عشر: العلاج الجيني Gene Therapy
271	الأساسيات العامة للعلاج بالجينات
272	العلاج الجيني بإصلاح الجين
272	الادينو فيروسات كحاملات في العلاج بالجينات
277	العلاج الجيني لتليف الرئة بواسطة الادينو فيروس

277	العلاج الجيني بالرتروفيروس
278	تركيب جزيئى الرتروفيروس
282	العلاج الجيني بالرتروفيروس لعلاج مرض نقص المناعة القاسية
284	الموصلات الطبيعية فى العلاج الجينى
285	استخدام الليبوسومات فى العلاج الجينى
287	العلاج الجينى العدوانى للسرطان
290	مرض تليف الرئة
291	مرض الخلايا المنجلية
292	العلاج الإنزيمي بالإحلال
293	الباب الثانى عشر: البيولوجيا الجزيئية للسرطان
	Molecular Biology of Cancer
293	ما هو السرطان ؟
294	المسرطنات
295	١. المسرطنات الكيميائية
296	٢. المسرطنات البيئية
297	٣. الأشعة
299	٤. الفيروسات المسرطنة
300	فيروس البابيلوما فى الإنسان
301	الادينو فيروس والبليومافيرس
301	ابستين- بار فيروس
302	فيروسات تليف الكبد B و C
302	السرطان التلقائى
303	المنشأ الوراثى للسرطان
305	الانقسام الخولى الطبيعى (دورة الخلية)
309	الجينات التى تسبب السرطان
309	١. البروتوانوكوجينات
310	٢. الجينات المضادة للسرطان أو الجينات المكبته للورم
312	اكتشاف الاونوكوجينات بواسطة التحول الوراثى
314	طرز الطفرات التى تولد الاونوكوجينات
316	تقدم التسورم
316	الموت الخولى
317	استحداث الموت الخولى

319	الباب الثالث عشر: التكاثر الكlonي في الحيوانات Clonal Reproduction in Animals
323	التكاثر الكlonي في الثدييات
324	كلونة (استنساخ) النعجة دوللي
328	فوائد التكاثر الكlonي
329	تحسين الماشية عن طريقة هندسة الممرات الحيوية
331	مشاكل وأخلاقيات التكاثر الكlonي (الإستزراع النووي)
332	مشاكل النمو في الحيوانات المكلونة أو المستنسخة
333	الرئيسيات المعدلة جينياً

المراجع
مُسرد وشرح المصطلحات

الباب الأول

الطبيعة الكيميائية للجينات

Chemical Nature of Genes or DNA

مقدمة تاريخية

منذ حوالي أربعة بلايين سنة كان جزيء الـDNA المزدوج الخيط (Double-strand) هو الجزيء المحفوظ والحامل للمعلومات الوراثية. ومنذ حوالي ٣,٧ بليون سنة كانت الخلايا البكتيرية الأولية تحتوي الـDNA في كروموسومها ووجد أيضاً منذ حوالي ٢ مليون سنة أن الخلايا النباتية والحيوانية والطحالب كانت كروموسوماتها أيضاً تحمل الـDNA. ومنذ ذلك الوقت لم يتغير تركيب جزيء الـDNA بينما على العكس من ذلك اتسع التطور بين الكائنات المختلفة وأمتد الى الاختلاف في برمجة المادة الوراثية أو المعلومات الوراثية التي تخزن في جزيء الـDNA. وتحت ظروف خاصة من وجود قليل من الأكسجين أو عدمه فإن جزيء الـDNA يقاوم المدى الواسع من درجات الحرارة والضغط والرطوبة ويظل ثابتاً نسبياً لمئات السنين حيث أوضحت الدراسات التي أجراها علماء البيولوجيا الجزيئية أن جزيء الـDNA المعزول من آثار لحفريات قديمة يظل حاملاً للمعلومات الوراثية وذلك من دراسة الـDNA المعزول من آثار الحمار البري المنقرض (Quagga) عمرها مائة عام وكذلك الـDNA المعزول من جمجمة أنسان عمرها ٨٠٠٠ عام وأيضاً الـDNA المعزول من الهيكل العظمي للإنسان الأولي Neanderthal والذي يبلغ عمره ٣٠٠٠ عام والذي اكتشف آثاره في ألمانيا عام ١٩٨٥ ولقد أكدت الأبحاث التي أجريت في التسعينات من القرن العشرين على عينات الـDNA القديمة أو الأثرية أن جزيء الـDNA يتمتع بدرجة عالية من الثبات الكيميائي مما يجعله جزيء التوارث.

وفى الثمانينات من القرن التاسع عشر استطاع مندل Mendel ونجاحه الباهر فى ذلك الوقت من استخدام البيانات الناتجة من تجارب التربية أن يستدل على وجود ونشاط الجينات (Genes) من خلال تحليل تأثير الأليلات المتبادلة (Alternative alleles) على الشكل المظهرى (Phenotype) وكذلك التلازم بين الجينات وحركة الكروموسومات فى الوقت والمكان الذى اكتشفه علماء الوراثة فى العقود الأولى من القرن العشرين. وبهذه الطريقة فإنه من الممكن التنبأ بنتائج التهجينات الوراثية فى غياب المعلومات التفصيلية عن الجزيئات والتفاعلات البيوكيميائية والتى تشكل الأساس فى الأحداث المشاهدة. ومع ذلك فإنه بدون فهمنا للجزيئات التى تحتوى على الجينات (Genes) يكون من المستحيل اكتشاف الآليات (Mechanisms) الحقيقية والتى عن طريقها تستطيع الجينات تحديد الشكل المظهرى وكذلك انتقال المعلومات الوراثية بين الأجيال واشتقاق المعلومات الوراثية الجديدة. ولهذه الأسباب سوف نتناول فحص وتركيب الـ DNA والذى تتركب منه المادة الوراثية عند المستوى الجزيئى ومن ثم سوف نتناول بالدراسة طبيعة تركيب الـ DNA وكذلك وظائفه الوراثية والتى تعتمد على بروتينات معينة تتفاعل مع الـ DNA والتى من بينها على سبيل المثال تلك البروتينات التى ترتبط بالـ DNA ليبدأ تضاعفه وعلى ذلك سوف نتناول النقاط التالية:

- ١- كيف أوضح العلماء أن الـ DNA هو المادة الوراثية.
 - ٢- النموذج البنائى لتركيب جزيء الـ DNA والذى وضعه العالمين واطسون (Watson) وكريك (Crick) .
 - ٣- كيف يقوم الـ DNA بحفظ المادة الوراثية.
 - ٤- كيف يقدم بناء جزيء الـ DNA الوسيلة الدقيقة لتضاعفه.
- ومن الحقائق العلمية المؤكده أن الـ DNA هو المادة الوراثية وذلك من نتائج التجارب المكثفة التى أجريت على مدى ثلاثين عاماً فى الفترة ما بين ١٩٢٢ وحتى عام ١٩٥٢ والتى أقنعت المؤسسات العلمية بأن الـ DNA هو جزيء التوارث (Molecule of heredity).

أولاً: الخصائص الكيميائية لموقع الـ DNA بالكروموسومات

فى عام ١٨٦٩ أستخلص العالم Friedrich Miescher مادة حامضية ضعيفة وغنية بالفوسفور من أنوية (Nuclei) خلايا الدم البيضاء فى الإنسان وسميت هذه المادة باسم نيوكلين (Nuclein) وهذه المادة لا تشبه عديد من المركبات الكيميائية السابق معرفتها ومعظم مكونات هذه المادة كانت الـ DNA على الرغم من أنها لم تكن نقيه تماماً والاسم الكيميائى للـ DNA هو (Deoxyribonucleic acid) والذى يتركب من وحدات بنائية معينة وبعد تنقية الـ DNA من أنوية الخلايا وبمعاملة عديدة من المعاملات المختلفة أوضح العلماء أن الوحدات البنائية المختلفة مرتبطة ببعضها فى صورة خيط طويل وتنتمى هذه الوحدات البنائية المختلفة الى قسم من المركبات يعرف باسم النيوكليوتيدات (Nucleotides) والتي ترتبط ببعضها عن طريق رابطة فوسفودايستر (Phosphodiester) مكونة خيط متعدد النيوكليوتيدات يعرف باسم (Polydexoyribonucleotide).

والطريقة التى ذكرت لأول مرة فى عام ١٩٢٧ لاكتشاف أين يقع الـ DNA فى الخلية سميت باسم تفاعل فولجين (Feulgen reaction) حيث يؤدى هذا التفاعل الى صبغ الـ DNA باللون الأحمر فى التحضيرات الخلوية المصبوغة بالفلوجين ووجد أن الكروموسومات تأخذ اللون بينما تظل باقى مكونات ومناطق الخلية عديمة اللون وبذلك أوضح وأكد هذا التفاعل أن الـ DNA يقع فى الكروموسومات ومع ذلك فان اكتشاف وقوع الـ DNA بالكروموسومات لم يوضح الدور الذى تقوم به الجينات أو الـ DNA فى ذلك الوقت. ونظراً لأن كروموسومات الكائنات حقيقية النواة (Eukaryotes) تحتوى على كميات كبيرة من البروتين وكذلك تتركب البروتينات من ٢٠ حامض أمينى مختلف بينما يحمل الـ DNA أربعة أنواع مختلفة من النيوكليوتيدات، أعتقد كثير من الباحثين فى ذلك الوقت أن البروتينات تحتوى على كثير من التنوع (Diversity) والذى يجعل من المفضل استخدامها كمادة وراثية ومع ذلك أعتقد نفس هؤلاء العلماء بأهمية الـ DNA كجزء هام من تركيب الكروموسومات.

ثانياً: التجارب التى أجريت لتحديد الـ DNA هو المادة الوراثية:

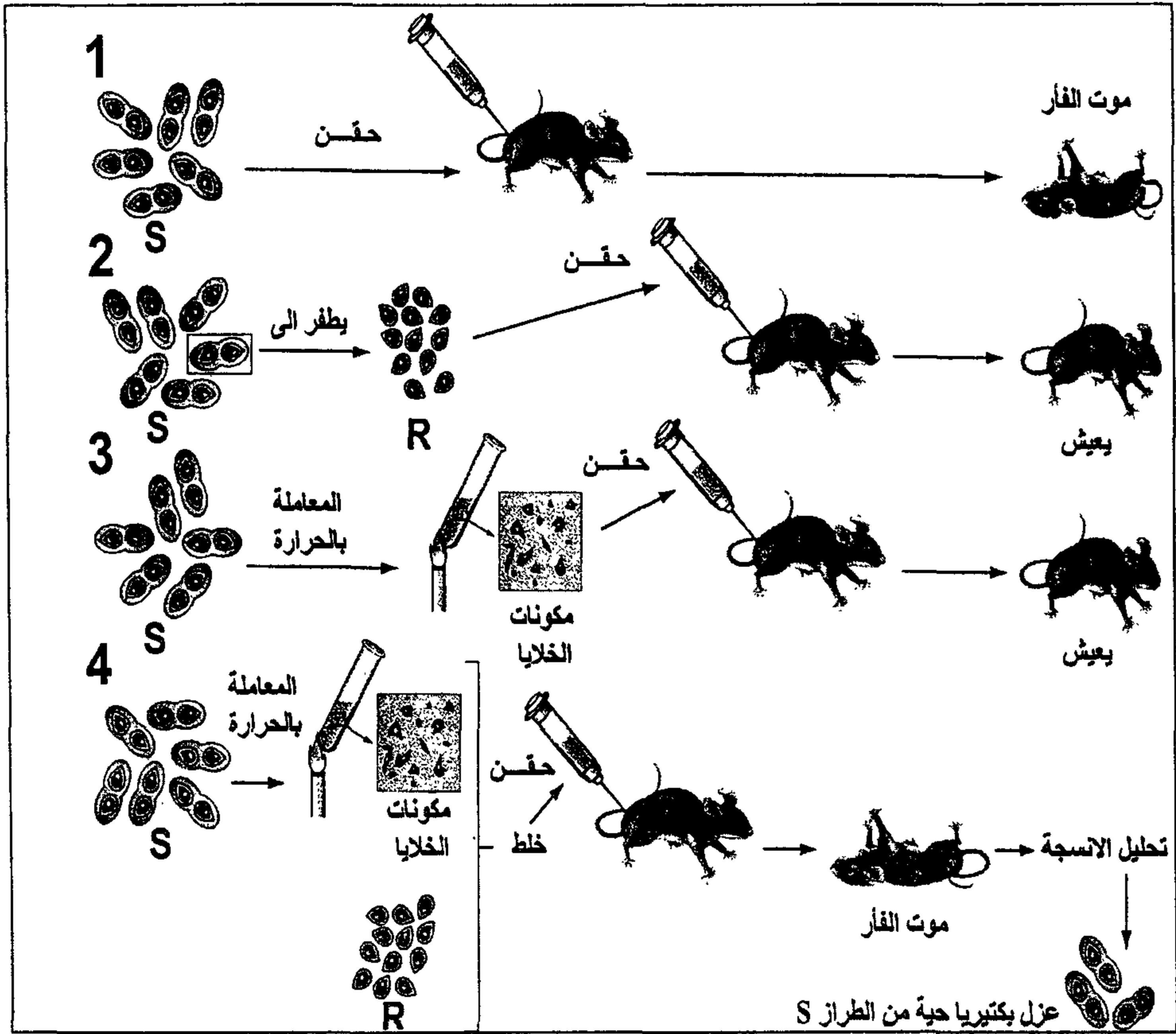
١- التحول الوراثى البكتيرى (Bacterial Transformation)

أكدت عديد من الدراسات فكرة أن الـ DNA يجب أن يكون هو المادة الوراثية ومن أهم تلك الدراسات تلك التى أجريت على البكتيريا. فالبكتيريا تحمل مادتها الوراثية فى صورة كروموسوم مفرد دائرى والذى يقع فى سيتوبلازم الخلية البكتيرية فى صورة شديدة الكثافة يعرف باسم نيوكليويد (Nucleoid) حيث لا يوجد غلاف نووى يحيط بهذا الكروموسوم ولذلك تعتبر الخلية البكتيرية أحادية التضاعف (Monoploid) وليست أحادية العدد الكروموسومى (Haploid) لأن ذلك العدد الأحادى من الكروموسومات يوجد فى الجاميطات المذكرة والمؤنثة فى الكائنات الراقية التى تتكاثر جنسياً، وعدم وجود نواة حقيقية وغلاف نووى يجعل البكتيريا من الكائنات غير حقيقية النواة (Prokaryotes) وهذا ما يميزها عن الكائنات حقيقية النواة (Eukaryotes) التى تحتوى خلاياها على نواة حقيقية بداخلها المادة الوراثية (الكروموسومات) وتحاط هذه النواة بغلاف نووى يفصل النواة عن سيتوبلازم الخلية كذلك تختلف البكتيريا عن الكائنات حقيقية النواة فى طريقة انقسامها الخلوى حيث لا تنقسم بطريقة الإنقسام الميتوزى بمراحله المعروفة ولكنها تنقسم بالانقسام الثنائى (Binary fission). مع وجود مثل هذه الاختلافات بين الكائنات حقيقية النواة وغير حقيقية النواة أعتقد بعض العلماء فى النصف الأول من القرن العشرين أن المادة الوراثية فى البكتيريا مماثلة لتلك الموجودة فى الكائنات حقيقية النواة. ومن بين المتطلبات الأساسية الوراثية فى البكتيريا كأي نوع آخر من الكائنات الراقية هو إمكانية تحديد الصور البديلة (Alternative forms) للصفة تحت الدراسة داخل العشيرة. وفى عام ١٩٢٣ استطاع العالم (Fredrick Griffith) من دراسة النوع البكتيرى *Streptococcus pneumoniae* وتنميته على بيئة غذائية من تحديد طرازين مظهريين من هذه البكتيريا (شكل ١) هما :

١- الطراز البكتيرى الناعم (S) وهو الطراز البرى من هذه البكتيريا ويرجع هذا المظهر الناعم (S) الى أن هذه البكتيريا تقوم بتخليق كبسولة (Capsule) من عديدات السكر تحيط بكل زوج من هذه الخلايا.

٢- الطراز الخشن (R) Rough وينشأ نتيجة لحدوث طفرة تلقائية في الطراز الناعم (S) يترتب عليها عدم مقدرة هذه البكتيريا على تكوين الكبسولة Capsule من عديدا السكر ولذلك تكون مستعمرات بكتيرية ذات مظهر خشن (R) . ولقد أصبح معروفاً في وقتنا الحالى أن الطراز الخشن (R) من البكتيريا يرجع الى أن هذه البكتيريا ينقصها إنزيم ما ضرورى لتخليق الكبسولة عديدة السكر والتي تساعد في حماية البكتيريا ذات الطراز الناعم (S) من المضادات الحيوية البكتيرية وتصبح قادرة على إحداث العدوى وتسبب موت معظم الحيوانات المعملية التي يهاجمها هذا الطراز من البكتيريا الناعمة وعلى العكس من ذلك فإن الطراز الخشن من هذه البكتيريا غير قادر على إحداث العدوى ويسبب الطراز الناعم من هذه البكتيريا الالتهاب الرئوى للإنسان.

فى عام ١٩٢٨ نشر العالم F. Griffith اكتشاف علمى مثير وهو أن المعلومات الوراثية فى الخلايا البكتيرية الميته من الطراز الناعم (S) يمكنها بطريقة ما الانتقال الى خلايا بكتيرية حيه من الطراز الخشن (R) ، فعند حقن الفأر ببكتيريا من الطراز الناعم (S) يسبب موت الفأر بينما حقن الفأر ببكتيريا من الطراز الخشن (R) لا يسبب موت الفأر. وكذلك عند حقن الفأر ببكتيريا من الطراز الناعم (S) والمقتولة بالحرارة لم تسبب موت الفأر بينما عند حقن الفأر بمخلوط من البكتيريا من الطراز الناعم (S) والمقتولة بالحرارة وببكتيريا حيه من الطراز الخشن (R) سبب ذلك موت الفأر (شكل ١) . كما وجد أن البكتيريا المعزولة من دم الفئران التي ظهرت عليها أعراض المرض وقبل أن تموت كانت من الطراز الناعم (S) حيث أنه حدث انتقال لشيء ما من البكتيريا المقتولة بالحرارة من الطراز الناعم (S) والذي قام بتحويل البكتيريا الحيه من الطراز الخشن (R) الى الطراز الناعم (S) وكان هذا التحول بصفة دائمة وثابتة وأن مثل هذا التحول غالباً ما يكون تحول وراثى (Genetic transformation) وذلك لأن كل الأجيال التالية من البكتيريا النامية على البيئة الغذائية كانت من الطراز الناعم (S) . وفى عام ١٩٢٩ قام معلمين بحثيين آخرين بإجراء تجارب مماثلة للتجارب السابقة وحصلوا على نفس النتائج السابقة.

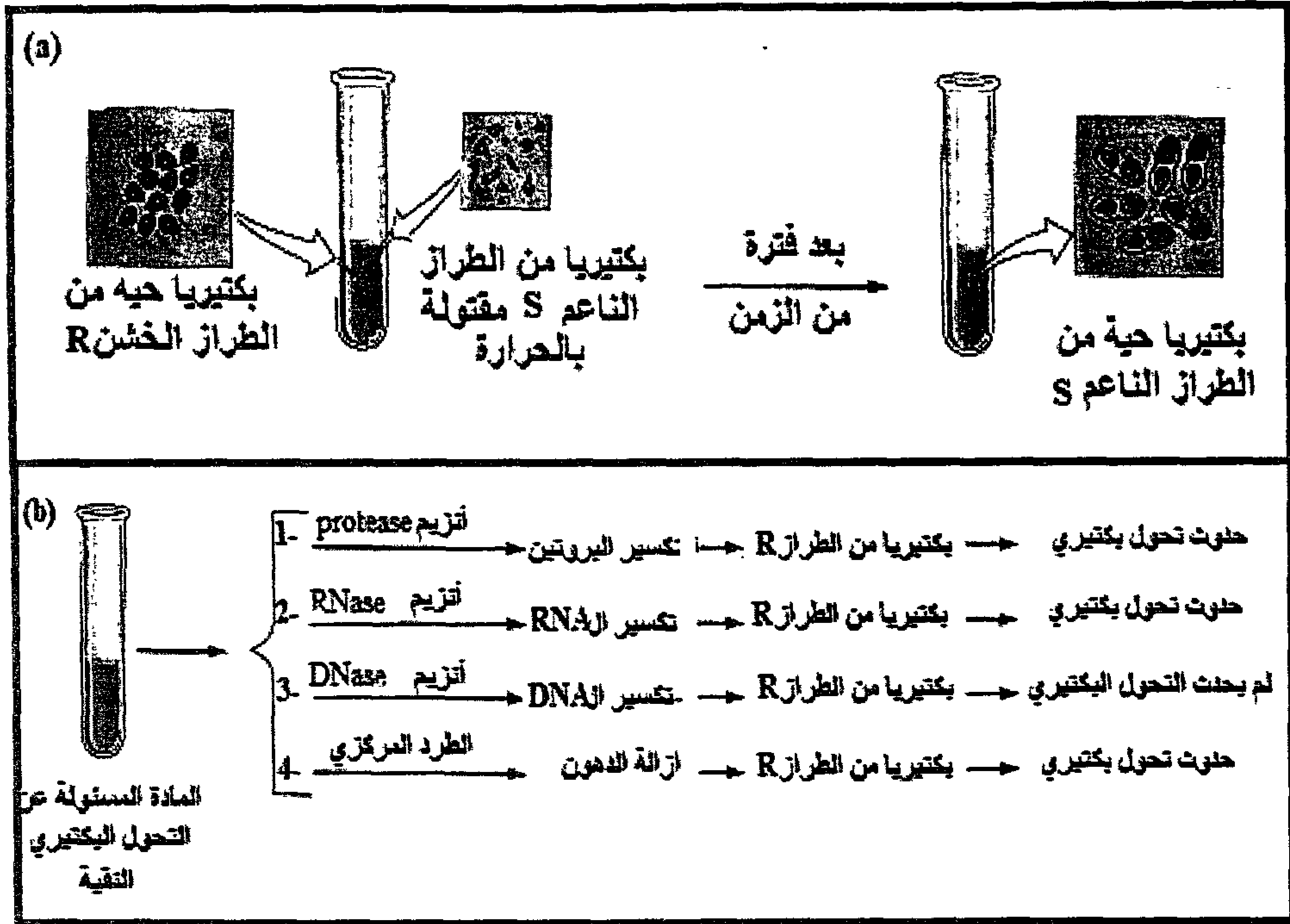


شكل (١) : تجارب Grilfith على التحول البكتيري

شرح شكل (١)

- ١ - البكتيريا من الطراز الناعم S والمعدية التي تسبب العدوى المميتة عند حقنها في الفأر .
- ٢ - حقن البكتيريا من الطراز الخشن R والطافرة من الطراز الناعم S وهي بكتيريا غير معدية وبالتالي لا تسبب عدوى مميتة للفأر (Mice).
- ٣ - حقن بكتيريا من الطراز الناعم S والمقتولة بالحرارة بالفئران وأنها لا تسبب العدوى المميتة للفأر (Mice).
- ٤ - حدوث العدوى المميتة للفأر عند حقنه بمخلوط من البكتيريا الناعمة S والمقتولة بالحرارة والبكتيريا من الطراز الخشن R وعزل بكتيريا من الطراز الناعم S من دم الفأر الذي شارف على الموت.

وفى عام ١٩٣١ وجد الباحثين فى معمل العالم Oswald Avery أنه يمكن الوصول الى التحول البكتيرى بدون استخدام أى حيوان معملى وذلك بتمية البكتيريا من الطراز الخشن (R) فى وجود مكونات البكتيريا من الطراز الناعم الميتة (شكل ٢). وقام العالم Avery بمحاولة تحديد المادة الوراثية فى مستخلصات البكتيريا التى سببت حدوث تحول البكتيريا من الطراز الخشن (R) غير الضارة لتصبح خلايا من الطراز الناعم (S) الممرضة ولقد أطلق Avery اسم أساس التحول (Transforming principle) على تلك المادة التى أحدثت هذا التحول البكتيرى. ولقد قضى العالم Avery عديد من السنين فى محاولة تنقية المادة المسئولة عن التحول البكتيرى بصورة كافية لتحديد كل دقة وبمجرد تنقيتها أمكن تحديد خصائصها ومواصفاتها وفى عام ١٩٤١ نشر العلماء Avery و Macleod و McCarty اكتشافاتهم المتجمعه من التجارب التى أجروها لتحديد التركيب الكيميائى للمادة المسئولة عن التحول البكتيرى (شكل ٢) ووجد أن هذه المادة كانت فعالة فى إحداث التحول البكتيرى بتركيزات منخفضة جداً وصلت الى تركيز جزء واحد لكل ٦٠٠ مليون جزء ولقد تأكدوا من أن المادة المسئولة عن التحول البكتيرى هى الـ DNA النقى ومع ذلك عرض الباحثون هذه المادة (DNA) الى عديد من الإنزيمات لمشاهدة ما إذا كان هناك جزيء آخر غير الـ DNA يمكنه أن يسبب التحول البكتيرى ووجدوا أن الإنزيمات التى تحطم أو تكسر كل من الـ RNA والبروتينات أو عديدات السكر ليس لها تأثير على المادة المسئولة عن التحول البكتيرى ولكن الإنزيم الذى يسبب تحطيم وتكسير الـ DNA تسبب فى فقد المادة المسئولة عن التحول لنشاطها ، وبناءاً على ذلك استنتج العلماء بكل تأكيد أن المادة المسئولة عن التحول البكتيرى هى الـ DNA ولقد ذهب العالم Avery الى أبعد من ذلك الى أن المادة المسئولة عن التحول البكتيرى ربما تكون هى الجين (Gene).

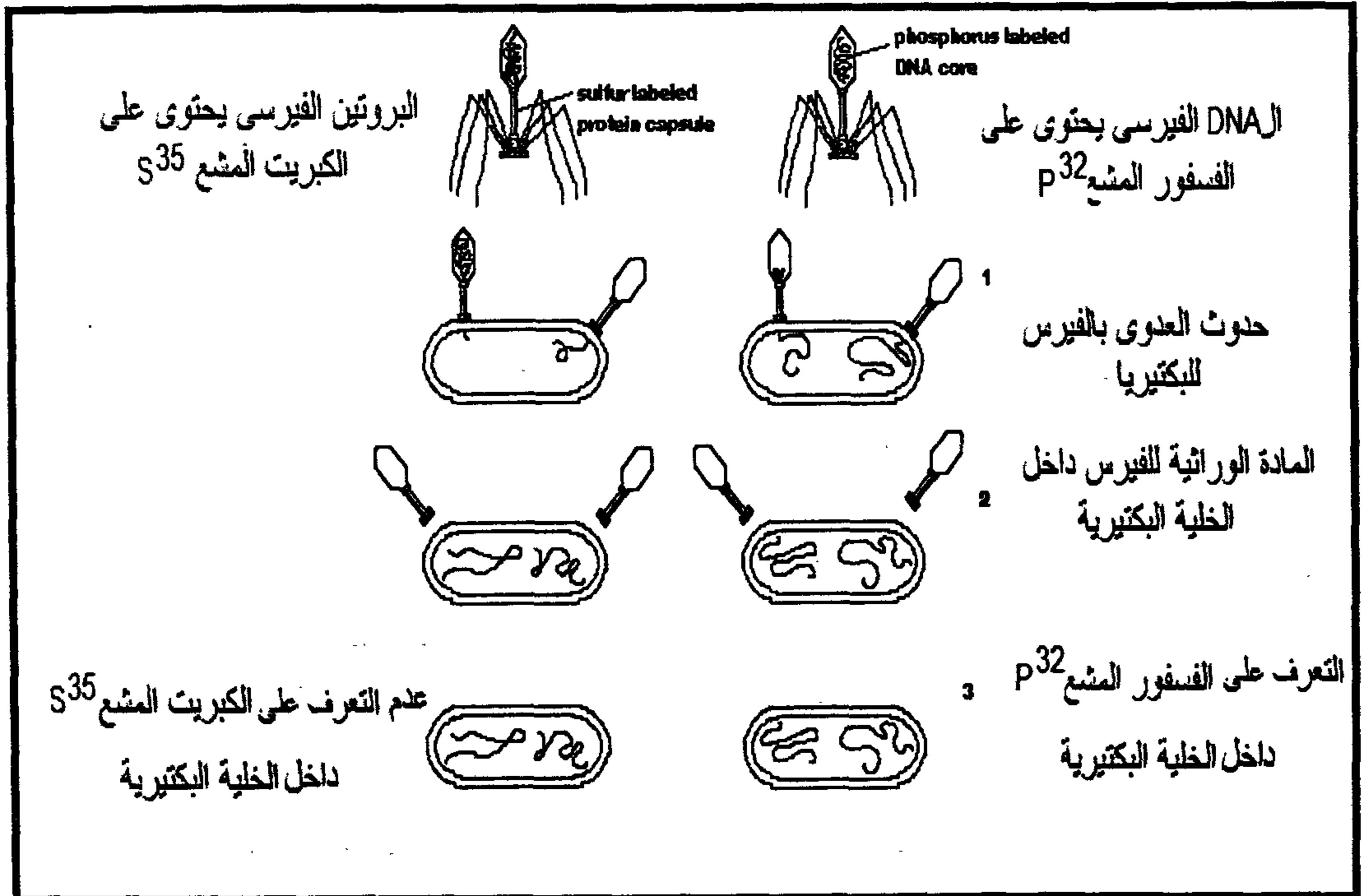


شكل (٢) : أساس التحول (Transforming Principle) هو الـ DNA والتجارب التأكيدية

- (a) - حدوث التحول البكتيري فى البيئة الغذائية التى تحتوى على مكونات البكتيريا الناعمة S المقتولة بالحرارة وبكتيريا من الطراز الخشن R الحية وتكوين بكتيريا حية من الطراز الناعم S.
- (b) - تنقية المادة المسؤولة عن التحول البكتيري فى صورة نقية ومعاملتها بالإنزيمات التالية:
- ١ - إنزيم الـ Protease الذى يحطم البروتين ومعاملته بالبكتيريا من الطراز الخشن R وحدث تحولها إلى الطراز الناعم S.
 - ٢ - إنزيم الـ RNase الذى يحطم الـ RNA ومعاملته بالبكتيريا من الطراز الخشن R وحدث تحولها إلى الطراز الناعم S.
 - ٣ - إنزيم الـ DNase الذى يحطم الـ DNA ومعاملته بالبكتيريا من الطراز الخشن R وعدم حدوث تحولها إلى الطراز الناعم S.
 - ٤ - عزل الدهون من مخلوط البكتيريا من الطراز الناعم S وحقق باقى المخلوط بالبكتيريا من الطراز الخشن R وحدث تحولها إلى الطراز الناعم S.

٢-دراسة المادة الوراثية المسؤولة عن تكاثر البكتريوفاج

كان كل من العالم Alfred Hershey والعالم Martha Chase سباقين في تحديد الأهمية النسبية لكل من الـDNA والبروتين في تكاثر وتضاعف الفيروسات التي تتطفل على الخلايا البكتيرية والمعروفة باسم البكتريوفاج (Bacteriophage) ويعتبر الفيروس (Virus) أبسط الكائنات من حيث التركيب والوظيفة حيث أنه يقع بطريقة ما بين الخلايا الحية القادرة على التكاثر الذاتي والجزيئات الكبيرة مثل البروتينات. وتعتمد الفيروسات على خلايا عائلته تقدم لها كل الآليات التي تحتاج إليها من أجل تكاثرها وتضاعفها كما أنها جزيئات صغيرة جداً وتحتوى على عدد قليل من الجينات. وبالنسبة لعديد من طرز الفيروسات فإن كل جزيء فيرسى منها يتركب من نسب متساوية من الـDNA والبروتين. هذه الجزيئات الفيروسيه تتكاثر فقط داخل الخلايا البكتيرية العائلة وبعد حوالى ٣٠ دقيقة من العدوى تتمزق الخلية البكتيرية العائلة ويتحرر من كل خلية بكتيرية حوالى مئات من جزيئات الفيروس الجديدة والسؤال الذى يفرض نفسه هو: ما هى المادة التى توجه وتدير إنتاج جزيئات جديدة فهل هى الـDNA أم البروتين؟ وللإجابة على ذلك قام كل من Chase و Hershey بتجارب رائده أجريت على البكتريوفاج T₂ حيث قاما بتتبع مجموعتين منفصلتين من هذا البكتريوفاج (T₂) على بكتيريا *E. coli* نامية على بيئتين غذائيتين مختلفتين حيث تحتوى البيئة الأولى على الفوسفور المشع (³²P) بينما تحتوى البيئة الثانية على الكبريت المشع (³⁵S). ونظراً لأن البروتينات تحتوى على الكبريت ولا تحتوى على الفوسفور بينما يحتوى الـDNA على الفوسفور ولا يحتوى على الكبريت وعلى ذلك تكون الفيروسات النامية على بيئة تحتوى على الكبريت المشع (³⁵S) سوف تحتوى على بروتين مشع بينما جزيئات الفيروس النامية على بيئة تحتوى على الفوسفور المشع (³²P) سوف تحتوى على DNA مشع، وبهذه الطريقة يستطيع الباحثين تحديد موقع أى مكون من مكونات الفيروس بالنسبة للخلية البكتيرية العائلة التى يهاجمها هذا الفيروس ويتكاثر بداخلها. ولقد وجدوا أنه بعد حدوث العدوى بالفيروس للخلية البكتيرية العائلة يظل البروتين المشع خارج الخلية البكتيرية العائلة بينما يدخل الـDNA المشع داخل الخلية البكتيرية والذى يوجه ويدير نشاط الخلية البكتيرية لتكوين جزيئات فيرسية جديدة واستنتجوا أن جينات الفيروس تتركب من الـDNA (شكل ٣).



شكل (3) : تجارب البكتريوفاج T_2 التى قدمت دليلاً على أن الجينات تتكون من الـ DNA

تركيب البكتريوفاج T_2 والذي يتكون من غلاف من البروتين يحيط بالـ DNA وكذلك جزيئات البكتريوفاج T_2 والى تحتوى على الـ DNA المعلم بالفسفور المشع P^{32} والى تحتوى على البروتين المعلم بالكبريت المشع S^{35} وحدث العدوى بأى منهما بالبكتيريا العائلة وملاحظة الإشعاع داخل الخلية البكتيرية العائلة فى الحالة الأولى وانتقاله إلى النسل الفيروس وعدم ملاحظة الإشعاع فى الحالة الثانية داخل الخلية العائلة وهذا يؤكد أن الـ DNA هو المادة الوراثية فى هذا البكتريوفاج T_2 .

ثالثاً: النموذج البنائي لجزيئى الـDNA

Chemical Composition Of DNA

أ- التركيب الكيميائى للـDNA

يتركب الـDNA كيميائياً من عدد طويل من الوحدات البنائية تعرف باسم النيوكليوتيده (Nucleotide) والتي ترتبط ببعضها برابطة فوسفودايستر (Phosphodiester) مكونة خيط

طويل من الـDNA وتتركب كل نيوكليوتيده من ثلاثة مكونات هي :

١- سكر الديزوكسى ريبوز Deoxyribose

٢- مجموعة فوسفات Phosphate group

٣- قاعدة نيتروجينية Nitrogen base

ويوجد أربعة قواعد نيتروجينية مختلفة هي:

ب- الجوانين Guanine (G)

أ- الأدينين Adenine (A)

وينتميان الى البيورين Purines

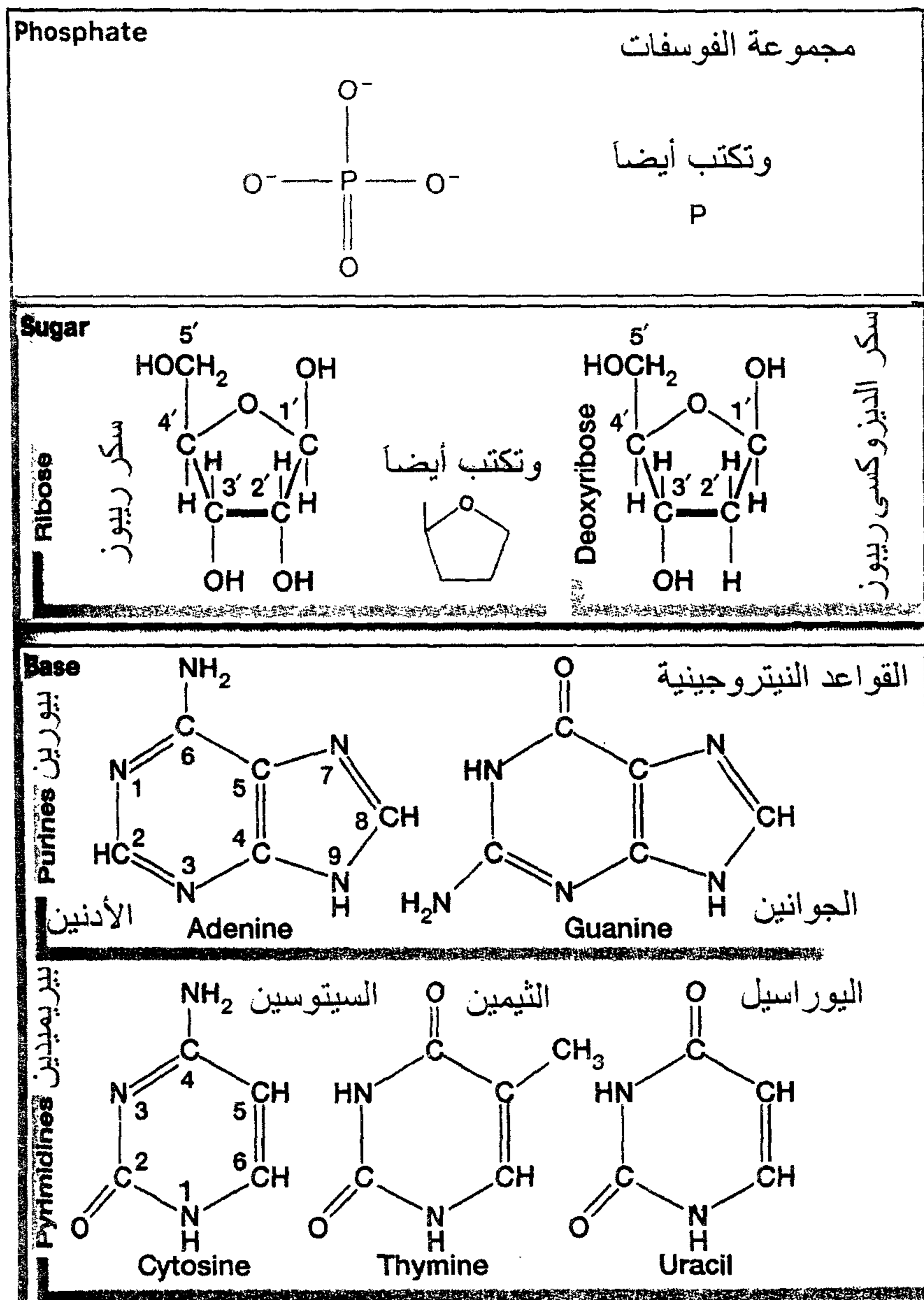
د- السيتوسين Cytosine (C)

ج- الثيمين Thymine (T)

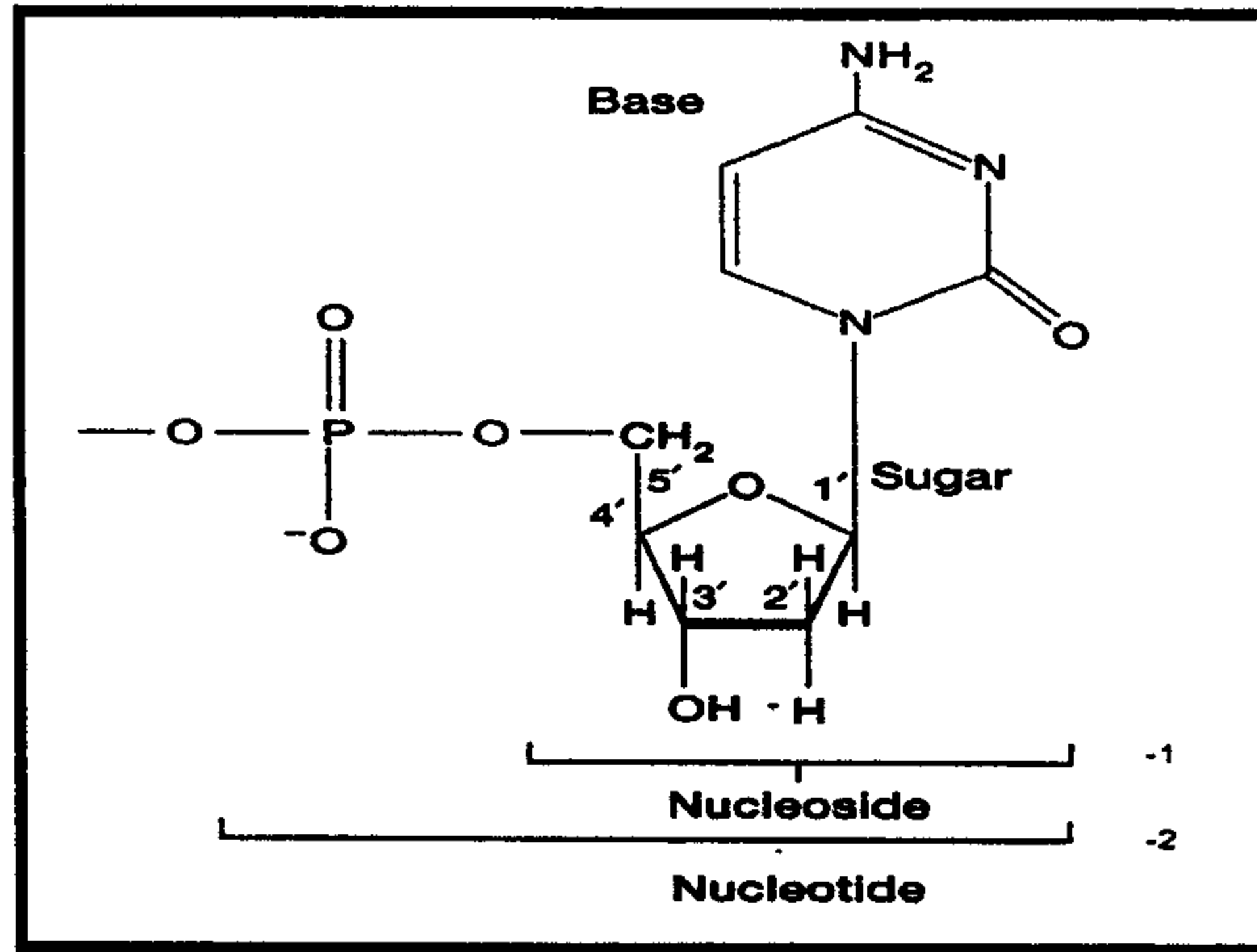
وينتميان الى البيريميدين Pyrimidines

ويوضح شكل (٤) التركيب الكيميائى لهذه المكونات وكيفية ارتباطها مع بعضها لتكوين النيوكليوتيدات (شكل ٥) وكذلك كيفية تكوين الرابطة الفوسفوداستر (Phosphodiester) والتي تحدث دائماً بين الكربون رقم 3' فى النيوكليوتيده الأولى والكربون رقم 5' فى النيوكليوتيده الثانية بين مجموعة الهيدروكسيل فى الكربون رقم 3' (OH - 3') فى النيوكليوتيده الأولى ومجموعة الفوسفات (P - 5') فى النيوكليوتيده الثانية وهكذا تتكون الروابط الفوسفوداستر على طول خيط الـDNA. وخيط الـDNA المكون من عديد من النيوكليوتيدات المختلفة له قطبيه (Polarity) ذات إتجاه محدد حيث أن الرابطة الفوسفودايستر التى تربط النيوكليوتيدات المتجاورة مع بعضها على طول خيط الـDNA تحدث دائماً بين كربون رقم 3' فى أحد النيوكليوتيدات وكربون رقم 5' فى النيوكليوتيده الأخرى (شكل ٦). وهذا الإتجاه المتناسق من البناء النيوكليوتيدى يجعل لخيط

الـDNA طرفين محددين أحدهما الطرف 5' حيث يكون السكر الموجود بالنيوكليوتيدة الطرفية به ذرة كربون حرة وهى ذرة الكربون رقم 5' بمعنى أنها لا ترتبط بأى نيوكليوتيدة أخرى طبقاً لكيفية الطريقة التى يتضاعف بها الـDNA أو الطريقة التى يتم بها عزله وبذلك فإن الكربون رقم 5' إما أن تحمل مجموعة هيدروكسيل أو مجموعة فوسفات. وفى الطرف الآخر من خيط الـDNA وهو الطرف 3' يوجد الكربون رقم 3' فى نفس النيوكليوتيدة الطرفية كربون حر. وعلى طول خيط الـDNA بين الطرفين 5' و 3' تكون القطبية محفوظة من نيوكليوتيدة لأخرى بمعنى أنه يمكن وصف خيط الـDNA فى صورة تتابع من النيوكليوتيدات الموجوده والتى تكتب من الطرف 5' الى الطرف 3' .



شكل (٤) : مكونات الوحدات البنائية للأحماض النووية (DNA & RNA).



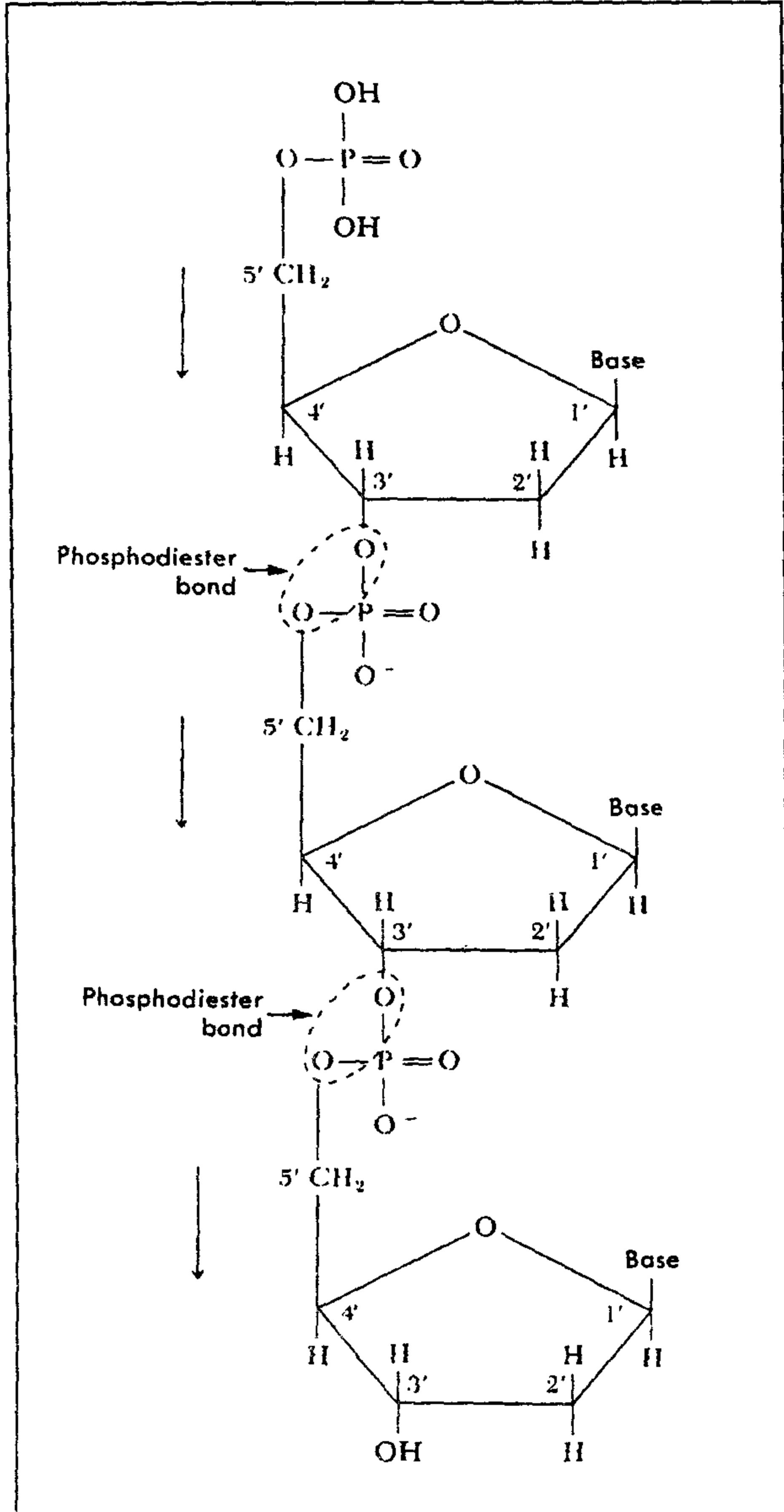
شكل (٥) : تجميع مكونات الوحدات البنائية للـ DNA

- ١- اتصال أو ارتباط القاعدة بالسكر لتكوين نيكليوسيد nucleoside حيث ترتبط القاعدة بـ ١ فى السكر.
- ٢- إضافة مجموعة الفوسفات للكربون رقم ٥ لتكوين النيوكليوتيدة (Nucleotide) .

ب- الـ DNA يحمل المعلومات الوراثية

نظراً لأن خيط الـ DNA يتكون من عدد من النيوكليوتيدات الأربعة وهى الأدينين (A) والجوانين (G) والثيمين (T) والسيتوسين (C) والتي يختلف عددها وتتابعها باختلاف الرسالة المحفوظة وبدون هذه الاختلافات من تتابع النيوكليوتيدى لا تكون هناك قدرة لهذا الـ DNA على حمل المعلومات الوراثية. ونظراً لأن العمود الفقرى لخيط الـ DNA عبارة عن ارتباط سكر الديزوكسى ريبوز مع مجموعة الفوسفات والذي يكون متطابق فى كل النيوكليوتيدات يصبح الاختلاف بين النيوكليوتيدات فى نوع القاعدة النيتروجينية فقط. وعلى ذلك إذا كان خيط الـ DNA يحمل المعلومات الوراثية فإن هذه المعلومات يجب أن تتمثل فى الاختلافات فى تتابع القواعد الأربعة (A, G, C, T) ومن ثم فإن المعلومات التى تتكون من هذه القواعد الأربعة سوف تماثل تلك الكلمات العديدة واللانهائية الناتجة من استخدام الحروف الابجدية (٢٦ حرف) وذلك من خلال التوافق الممكنة بين هذه الحروف بالطرق المختلفة وذلك لتوليد الكلمات اللازمة لعمل

كتاب ضخيم يضم آلاف الصفحات المكتوبة وبالتالي فإن استخدام التوافق الممكنة المختلفة بين هذه القواعد الأربعة (T, C, G, A) في تتابع طويل من النيوكليوتيدات يمكنها أن تحمل المعلومات اللازمة لبناء الكائن الحي.



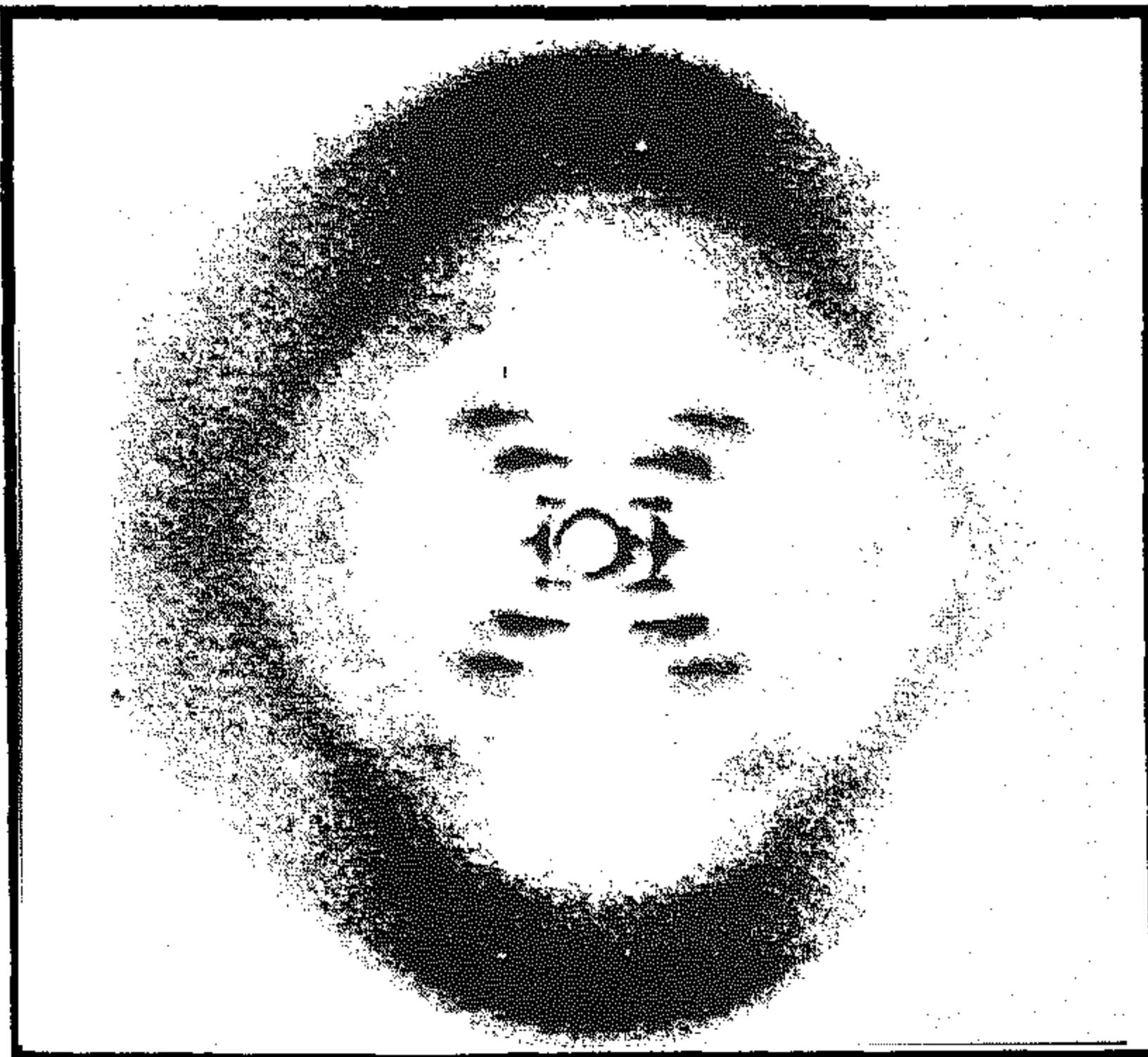
شكل (٦) : ارتباط النيوكليوتيدات ببعضها عن طريق الرابطة الفسفودايستر (Phosphodiester) والتي تحدث دائماً بين مجموعة الهيدروكسيل في كربون رقم 3' في النيوكليوتيدة الأولى ومجموعة الفوسفات في كربون رقم 5' في النيوكليوتيدة الثانية وبذلك يتكون خيط من الـ DNA متعدد النيوكليوتيدات polymer chain له طرفين، أحدهما الطرف 3' وينتهي دائماً بمجموعة الهيدروكسيل في الكربون رقم 3' (3'-OH) والطرف الآخر هو 5' وينتهي بوجود مجموعة فوسفات بالكربون رقم 5' في النيوكليوتيدة الطرفية (5'-P)

ج- نموذج الحلزون المزدوج لبناء جزيء الـ DNA DNA Double Helix Model

نظراً لأنه يمكن للمعلومات أن تشفر فقط فى تتابع معين من القواعد النيتروجينية والتي يختلف عددها وترتيبها وتتابعها باختلاف الرسالة المحفوظة فى الـ DNA بالكائن والتي تختلف من كائن لآخر اكتشف كريك (Crick) وواطسون (Watson) النموذج البنائى لجزيء الـ DNA والذي يتمشى مع نظرية داروين للتطور (Darwin's theory of evolution) للانتخاب الطبيعى وقوانين مندل للتوارث وتفسيرهما لفهمنا للظواهر البيولوجية (Biological phenomena). فى أبريل عام ١٩٥٣ نشر كريك (Crick) وواطسون (Watson) النموذج البنائى لتركيب جزيء الـ DNA والمعروف باسمهما Waston - Crick DNA model فى مجلة Nature العلمية واعتمدوا فى بنائهم لجزيء الـ DNA على نتائج الأبحاث التى أجريت فى إتجاهين مختلفين هما:

١. دراسة جزيئات الـ DNA بواسطة الأشعة السينية X-rays

قام بهذه الدراسة العالمين Franklin , Wilkines وأوضحت نتائج أبحاثهم على جزيئات الـ DNA بواسطة الأشعة السينية (شكل ٧) أن هذا الجزيء (DNA) حلزونى الشكل (Helix) مكون من دورات متكررة من الحلزون وأن المسافة بين هذه الوحدات المتكررة تساوى ٣,٤ انجستروم (3.4 \AA) وتشكل كل دوره من دورات الحلزون مسافة مقدارها ٣٤ انجستروم (34 \AA) وأن قطر هذا الجزيء يساوى ٢٠ انجستروم (20 \AA).



شكل (٧) : نظام التمييز
X-rays diffraction الناتج من معاملة
جزيئات الـ DNA بالأشعة السينية x-rays
والتي عكست البناء الحلزونى
(Helical structure) للـ DNA .

٢. التحليل الكيميائي لجزيئات الـDNA من مصادر مختلفة

قام العالم Erwin Chargaff بتحليل التركيب النيوكليوتيدى لجزيئات الـDNA من مصادر مختلفة وبافتراض أن جزيئى الـDNA يتركب من خططين عديدة النيوكليوتيدات فما هى القوى التى يجب أن تربط الخططين معاً؟ لذلك فإن معرفة التركيب النيوكليوتيدى لجزيئات الـDNA من مصادر مختلفة تقدم مفتاحاً لذلك فى غاية الأهمية. ولقد أوضحت النتائج التى حصل عليها شارجاف (Chargaff) الحقائق التالية (جدول ١) :

١- أن كمية الثيمين (T) تساوى كمية الأدينين (A)

٢- أن كمية الجوانين (G) تساوى كمية السيتوسين (C)

٣- كمية الـDNA تختلف باختلاف الكائنات وتزداد بزيادة تعقيد الكائن.

٤- النسبة بين $\frac{A + G}{T + C}$ تساوى واحد تقريباً.

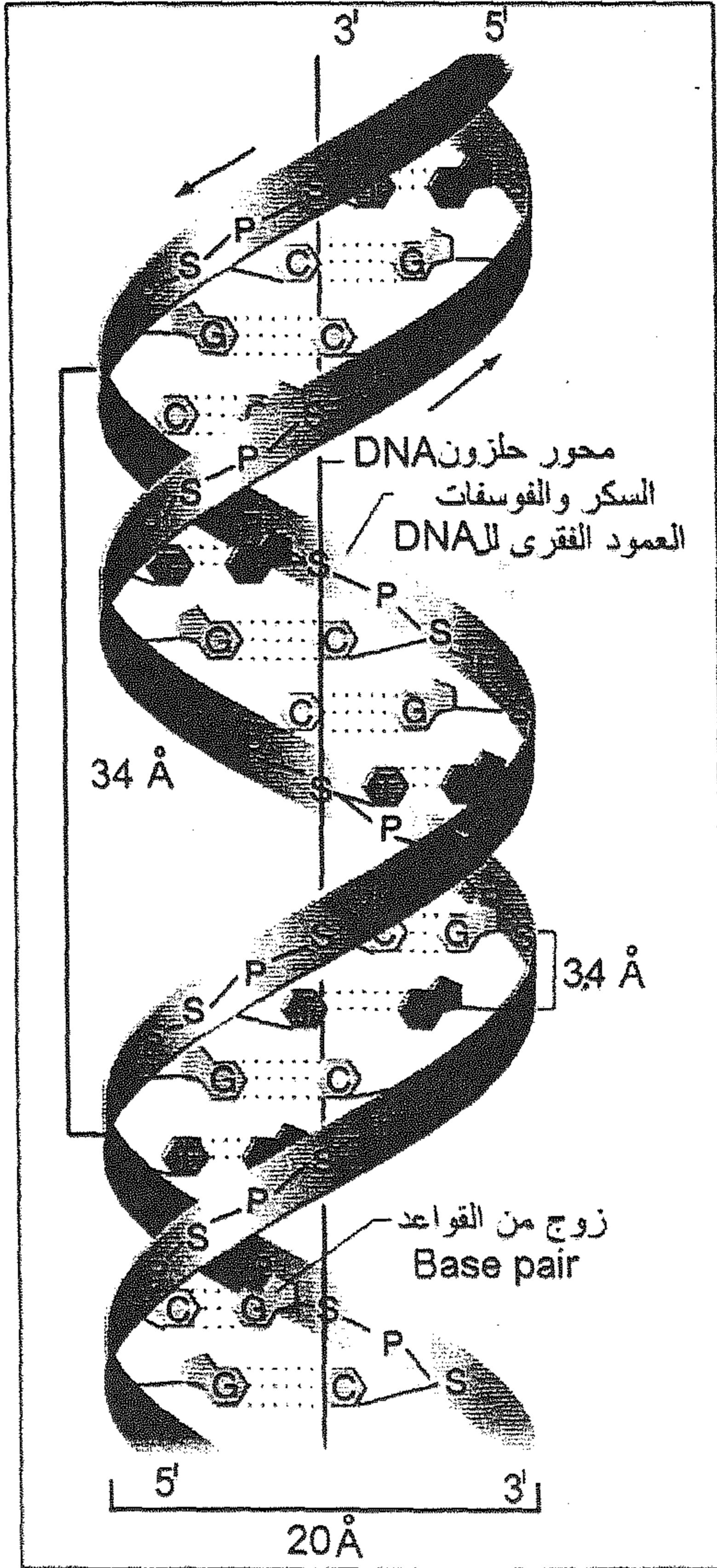
وذلك فى جميع الكائنات التى درست وأيضاً فى كل الكائنات الأخرى سواء الكائنات غير حقيقية النواة (Prokaryotes) أو الكائنات حقيقية النواة (Eukaryotes).

ولقد استخدم العالمين واطسون (Watson) وكريك (Crick) النتائج المتحصل عليها من التفريق بالأشعة السينية (X-rays diffraction) وكذلك المتحصل عليها من التحليل الكيميائى لجزيئات الـDNA من مصادر مختلفة ووضعوا النموذج البنائى للـDNA وهو نموذج الحلزونى المزدوج (Double helix model) والذى يتميز بالخصائص التالية (شكل ٨) .

جدول (١) : يوضح النتائج التى حصل عليها Chargaff لتركيب القواعد بالنيوكليوتيدات لجزيئات من الـ DNA من كائنات مختلفة

Species	% Adenine (A)	% Guanine (G)	% Cytosine (C)	% Thymine (T)	$\frac{A + G}{T + C}$
I. Viruses					
Bacteriophage λ	26.0	23.8	24.3	25.8	0.99
Bacteriophage T2	32.6	18.1	16.6	32.6	1.03
Herpes simplex	13.8	37.7	35.6	12.8	1.06
II. Bacteria					
<i>Escherichia coli</i>	26.0	24.9	25.2	23.9	1.04
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	14.4	37.3	34.6	13.7	1.07
<i>Ramibacterium ramosum</i>	35.1	14.9	15.2	34.8	1.00
III. Fungi					
<i>Neurospora crassa</i>	23.0	27.1	26.6	23.3	1.00
<i>Aspergillus niger</i>	25.0	25.1	25.0	24.9	1.00
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31.7	18.3	17.4	32.6	1.00
IV. Higher Eukaryotes					
<i>Zea mays</i> (corn)	25.6	24.5	24.6	25.3	1.00
<i>Drosophila melanogaster</i>	30.7	19.6	20.2	29.4	1.01
<i>Homo sapiens</i> (human)	30.2	19.9	19.6	30.3	1.01

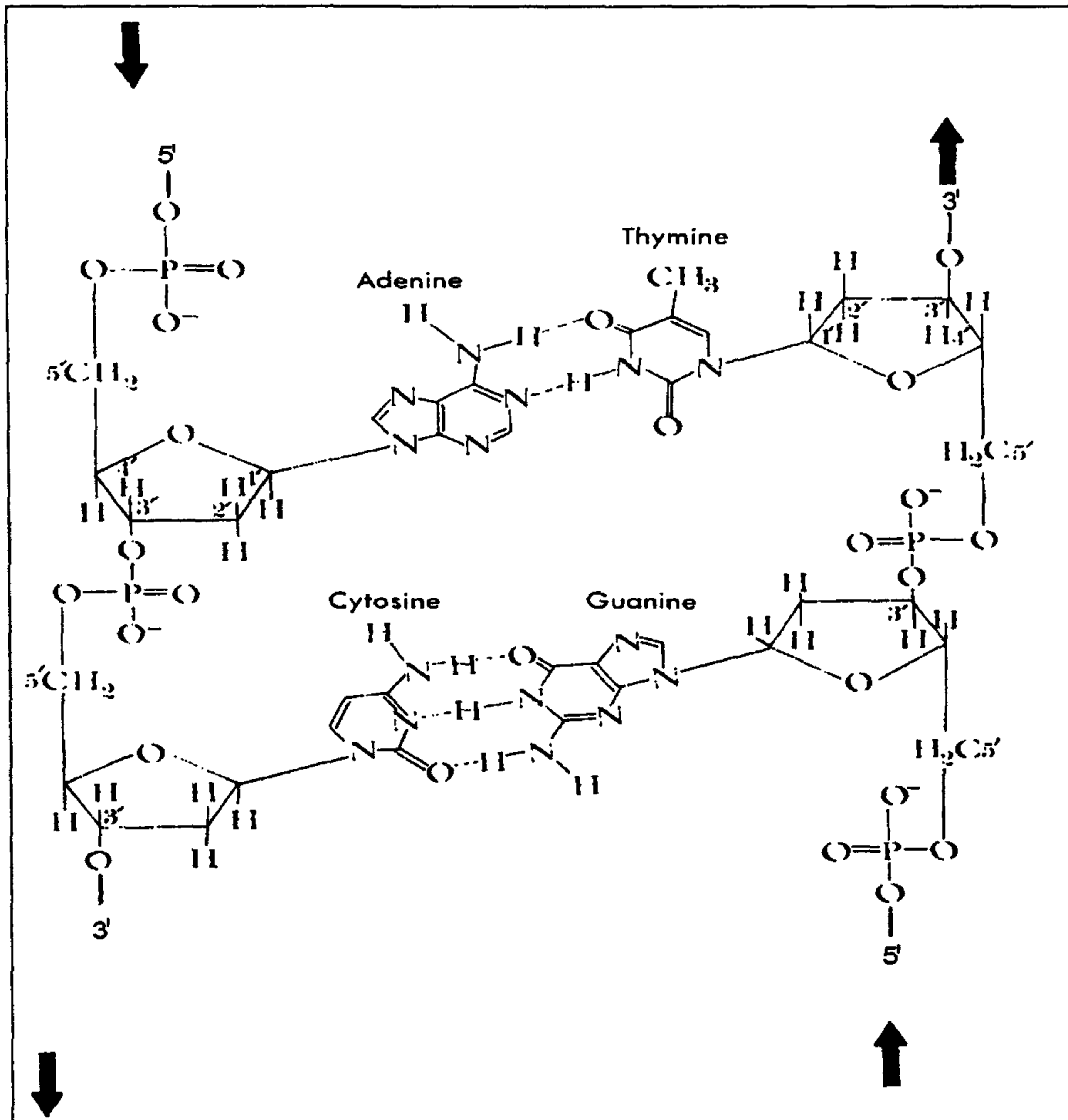
- ١- يتركب الـ DNA من حلزون مزدوج الخيط (Double-helix) حيث يتركب كل خيط من عديد من النيوكليوتيدات والتي ترتبط ببعضها عن طريق الرابطة فوسفودايستر (Phosphodiester).
- ٢- يمثل كل من السكر والفوسفات العمود الفقرى لخيط الـ DNA.
- ٣- يلتف الخيطان حول بعضهما حلزونيا فى دورات متكرره من الحلزون وطول كل دوره منها تساوى ٣.٤ انجستروم (34 \AA) وتضم كل دوره من الحلزون ١٠ أزواج من النيوكليوتيدات حيث يشغل كل زوج من النيوكليوتيدات مسافة مقدارها ٣,٤ انجستروم (3.4 \AA) وأن قطر هذا الحلزون المزدوج يساوى ٢٠ أنجستروم (20 \AA).
- ٤- يقترن دائماً الأدينين (A) فى أحد الخيطين بالثيمين (T) فى الخيط الآخر برابطتين هيدروجينيتين بينما يقترن الجوانين (G) بالسيتوسين (C) بثلاثة روابط هيدروجينية.
- ٥- قطبية خيطى الـ DNA فى الحلزون المزدوج تكون فى إتجاه معاكس حيث تكون القطبيه فى أحد الخيطين فى الإتجاه $5' \rightarrow 3'$ بينما تكون فى الخيط الآخر فى الإتجاه $3' \rightarrow 5'$ (شكل ٩)



شكل (٨) : نموذج الحلزون المزدوج

Double helix للـ DNA

حيث يلتف خطي الـ DNA حول بعضهما حلزونياً في دورات متكررة كل دورة طولها ٣٤ انجستروم تضم عشرة أزواج من النيوكليوتيدات وبالتالي يشغل كل زوج منها مسافة ٣,٤ انجستروم وأن قطر هذا الحلزون يساوي ٢٠ انجستروم (20 Å).



شكل (٩) : يوضح طبيعة الروابط الهيدروجينية التى تربط خطي الـ DNA ببعضها وتكوين خيط الـ DNA المزدوج الخيط، حيث يرتبط دائماً الأدينين (A) والثيمين (T) برابطتين هيدروجينيتين ويرتبط الجوانين (G) مع السيتوسين (C) بثلاثة روابط هيدروجينية. كذلك يكون الخيطين من حيث القطبية فى إتجاهين متضادين حيث يكون أحدهما فى الإتجاه 5' ← 3' والآخر فى الإتجاه 3' ← 5' .

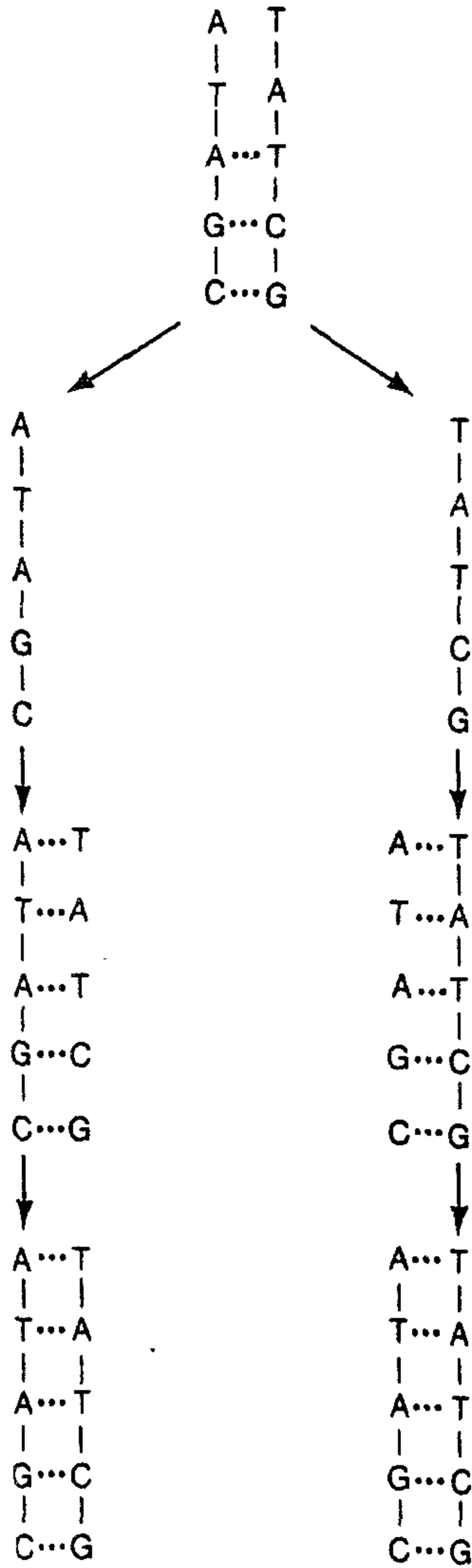
DNA Replicationرابعاً: تضاعف الـDNA

بعد أن وضع العالمين واطسون (Watson) وكريك (Crick) النموذج البنائي للـDNA وهو نموذج الحلزون المزدوج (Double helix model) أقترحاً أيضاً في نفس الوقت الطريقة أو الآلية التي يتضاعف بها الـDNA وتتضمن هذه الآلية ما يلي (شكل ١٠)

١- انفصال الخيطين الأبوين (Parental double helix) والذي يحتاج الى كسر الروابط الهيدروجينية بين القواعد النيتروجينية المقترنة ببعضها. وهذه الروابط الهيدروجينية على درجة عالية من التخصص حيث يقترن دائماً الثيمين (T) مع الأدينين (A) برابطتين هيدروجينيتين (A=T) بينما يرتبط الجوانين (G) مع السيتوسين (C) بثلاثة روابط هيدروجينية (G ≡ C) ، ومع ذلك فان هذه الروابط ضعيفة يمكن كسرها.

٢- يعمل كل خيط من الخيطين الأبوين كخيط مطبوعى او قالب (Template) لتكوين خيط جديد من الـDNA وذلك من خلال الاقتران بين القواعد المكملة .

وعلى الرغم من أن هذه الطريقة لتضاعف الـDNA تقدم الوسيلة التي يتم بها نسخ المعلومات الوراثية من جزيئات الـDNA الأبوية (القديمة) وتكوين جزيئات جديدة من الـDNA فانه نشأ تساؤل: هل يتضاعف الـDNA بالطريقة المحافظة (Conservative replication) بحيث يظل الخيطين الأبوين القديمين (Old) معاً ويكون الخيطين الجديدين (New) حلزون مزدوج جديد أم يتم التضاعف بالطريقة نصف المحافظ (Semi-conservative replication) والتي ينتج عنها تكوين جزيئين من الـDNA يحتوى كل جزئ منها على خيط قديم (Old) وخيط جديد (New) من الـDNA (شكل ١٠) .



١- الحلزون المزدوج الأبوي (Parental double helix).

٢- كسر الروابط الهيدروجينية وانفصال الخيطين الأبويين

٣- حدوث الاقتران بين النيوكليوتيدات المكملة في كلا الخيطين الجديدين
وتلك الموجودة في الخيطين الأبويين وتكوين الروابط الهيدروجينية
(G ≡ C, A = T)

٤- تكوين الروابط الفوسفودايستر بين النيوكليوتيدات في الخيطين الجديدين. وبذلك
من الـ DNA متطابقان تماماً ومطابقان للحلزون المزدوج الأبوي

شكل (١٠) : آلية تضاعف الـ DNA التي أقترحها العالمين واطسون (Watson) وكريك (Crick)
بالطريقة نصف المحافظة.

ولقد أكدت الأبحاث أن تضاعف الـ DNA يتم بالطريقة نصف المحافظ وفيما يلي الدليل على ذلك من خلال التجربة الرائدة والكلاسيكية التي أجراها العالمين M. Meselson و F. Stahl وذلك باستخدام النيتروجين الثقيل Heavy (^{15}N) لتعليم وتمييز جزيئات الـ DNA الجديدة (New) عن تلك القديمة (Old) والتي تحتوى على النيتروجين الخفيف light (N) وبذلك يمكن التمييز بين طرز جزيئات الـ DNA التالية:

- ١- جزيئات الـ DNA التي تحتوى على النيتروجين الخفيف في كلا الخيطين ($^{14}\text{N}^{14}\text{N}$).
- ٢- جزيئات الـ DNA التي تحتوى على النيتروجين الثقيل في كلا الخيطين ($^{15}\text{N}^{15}\text{N}$).
- ٣- جزيئات الـ DNA الهجينية (Hybrid) التي يحتوى أحد الخيطين على النيتروجين الخفيف ويحتوى الخيط الآخر على النيتروجين الثقيل ($^{15}\text{N}^{14}\text{N}$).

وهذه الجزيئات المختلفة يمكن تمييزها عن بعضها باستخدام الطرد المركزي لهذه الجزيئات في محلول كلوريد السيزيوم متدرج التركيز حيث يتجمع كل طراز منها في موقع محدد من أنبوبة الطرد المركزي بحيث يتناسب تركيزها مع تركيز محلول كلوريد السيزيوم. وتتلخص الطريقة التي استخدمها هذين العالمين في الخطوات التالية (شكل ١١).

١. تنمية البكتيريا *E. coli* على بيئة غذائية تحتوى على أملاح أمونيوم (Ammonium salts) مجهزة بالنيتروجين الثقيل (^{15}N) لعدد من الأجيال وبذلك تصبح البكتيريا النامية محتوية على جزيئات الـ DNA معلمة بالنيتروجين الثقيل في كلا خيطي الـ DNA ($^{15}\text{N}^{15}\text{N}$).
٢. أخذ عينة من الخلايا السابقة وتركها تنمو لمدة جيل واحد (F_1) على بيئة غذائية تحتوى على النيتروجين الخفيف (^{14}N).
٣. أخذ عينة أخرى من البكتيريا النامية على البيئة الأولى وتركها تنمو لمدة جيلين (F_2) على بيئة تحتوى على النيتروجين الخفيف (^{14}N).

٤. عزل جزيئات الـ DNA من البكتيريا النامية على البيئات الغذائية وتقدير مستوى ترسيبها وتكوين حزم (Bands) فى أنبوبة الطرد المركزى التى تحتوى على محلول متدرج التركيز من كلوريد السيزيوم وتتلخص النتائج التى حصلنا عليها فيما يلى:

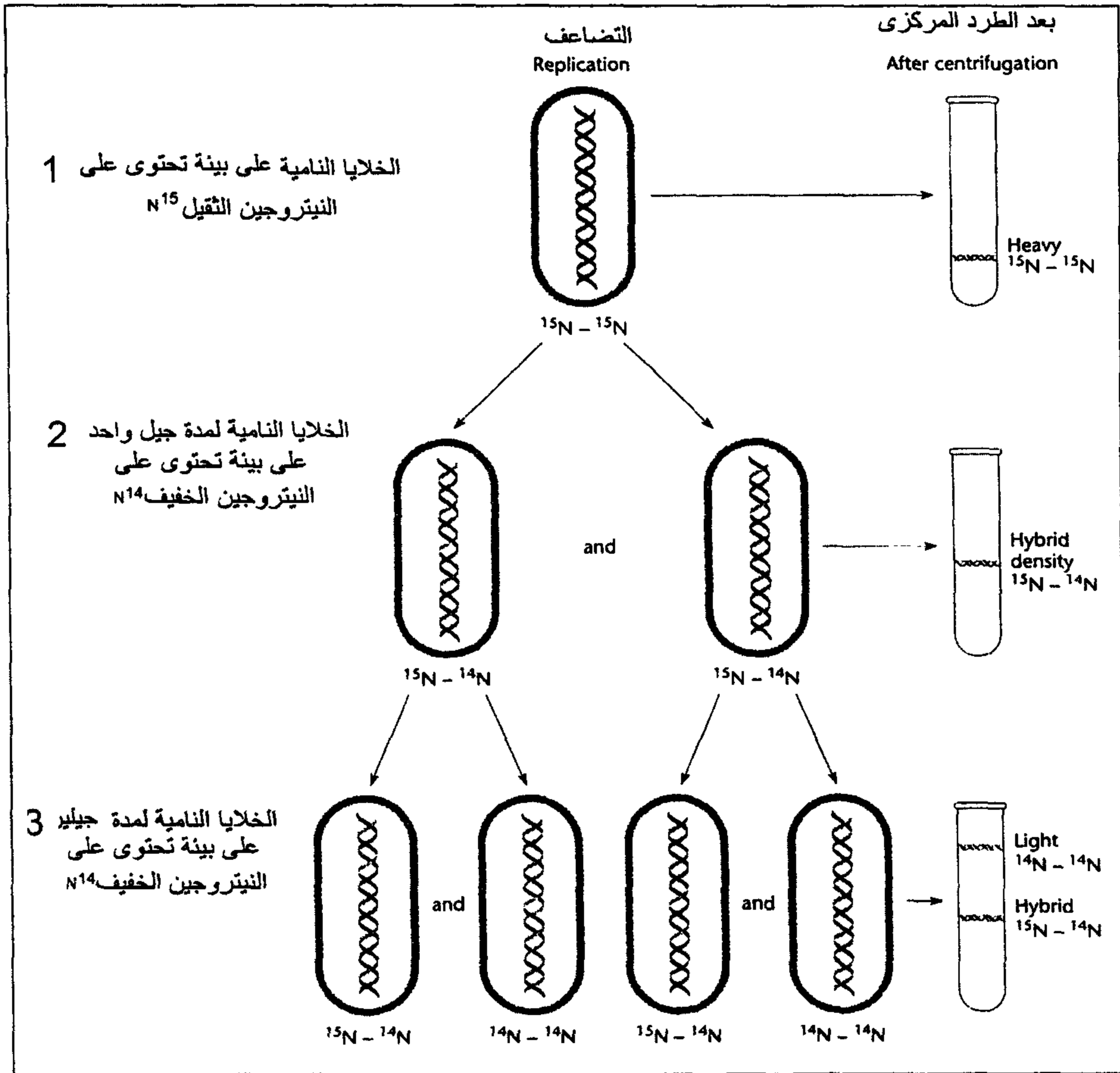
(١) جزيئات الـ DNA المعزولة من البكتيريا التى نمت على البيئة التى تحتوى على النيتروجين الثقيل كونت حزمة (Band) واحدة قريبة من أسفل الأنبوبة بما يتناسب مع تركيزها (شكل ١١).

(٢) جزيئات الـ DNA المعزولة من بكتيريا الجيل الأول (F_1) كونت حزمة واحدة أيضاً فى وسط الأنبوبة (شكل ١١).

(٣) جزيئات الـ DNA المعزولة من بكتيريا الجيل الثانى (F_2) كونت حزمتين (2 bands) أحدهما قريبة من أعلى الأنبوبة والأخرى فى وسط الأنبوبة فى مستوى يماثل مستوى الحزمة المتكونة من جزيئات الـ DNA المعزولة من بكتيريا الجيل الأول F_1 (شكل ١١).

وهذه النتائج تتفق وتتسجم مع تضاعف الـ DNA بالطريقة نصف المحافظ كما هو مبين بالرسم التوضيحي (شكل ١١). ومما يؤكد ولا يدع مجالاً لأى شك أنه إذا تضاعف الـ DNA بالطريقة المحافظة لأظهرت جزيئات الـ DNA المعزولة من بكتيريا الجيل الأول (F_1) حزمتين أحدهما تحتوى على جزيئات الـ DNA التى تحتوى على النيتروجين الخفيف فى كلا الخيطين الـ $(^{14}\text{N}^{14}\text{N})$ وسوف تقع فى أعلى الأنبوبة والحزمة الأخرى تحتوى على النيتروجين الثقيل فى كلا خيطى الـ $(^{15}\text{N}^{15}\text{N})$ وسوف تقع هذه الحزمة بالقرب من أسفل الأنبوبة وهذا لم يحدث ولم يشاهد حيث شوهد حزمة واحدة تمثل الـ DNA الهجينى $(^{15}\text{N}^{14}\text{N})$ فى موقع متوسط فى أنبوبة الطرد المركزى يقع بين مستوى ترسيب النيتروجين الثقيل فى الخيطين $(^{15}\text{N}^{15}\text{N})$ ومستوى ترسيب النيتروجين الخفيف فى كلا الخيطين $(^{14}\text{N}^{14}\text{N})$ كما هو مبين فى (شكل ١١). وتؤكد هذه النتائج مرة ثانية أن جزيء الـ DNA ذو الحلزون المزدوج (Double helix) يتضاعف بالطريقة نصف المحافظ وليس بالطريقة المحافظة. كذلك أوضحت نتائج التجارب التى أجريت بعد ذلك على الخلايا النباتية فى مزارع الأنسجة

أن تضاعف الـ DNA في الكائنات حقيقية النواة يحدث أيضاً بالطريقة نصف المحافظ. وعلى ذلك يتضح جلياً أن تضاعف الـ DNA يحدث بالطريقة نصف المحافظ في كلاً من الكائنات غير حقيقية النواة (Prokaryotes) والكائنات حقيقية النواة (Eukaryotes).



شكل (١١): تجربة العالمين ميسلسون (Miselson) وستاهل (Stahl) وتفسيرها على أساس تضاعف الـ DNA بالطريقة نصف المحافظة.

شرح شكل (١١)

١ - البكتيريا النامية على بيئة تحتوى على النيتروجين الثقيل (^{15}N) وتكوين حزمة واحدة قريبة من أسفل أنبوبة الطرد المركزى.

٢ - نمو البكتيريات التى تحتوى على النيتروجين الثقيل لمدة جيل واحد (F_1) على بيئة تحتوى على النيتروجين الخفيف (^{14}N) وتكوين حزمة واحدة فى وسط أنبوبة الطرد المركزى.

٣ - نمو البكتيريا التى تحتوى على النيتروجين الثقيل على بيئة تحتوى على النيتروجين الخفيف (^{14}N) لمدة جيلين (F_2) وتكوين حزمتين إحداهما فى نفس مستوى الحالة السابقة والأخرى قريبة من قمة أنبوبة الطرد المركزى.

DNA Replication Mechanismآلية تضاعف الـ DNA

فى السنين التى تلت اكتشاف تضاعف الـ DNA بالطريقة نصف المحافظ كشف عدد آخر من العلماء الغطاء عن عديد من النقاط الهامة والمتعلقة بمتطلبات آلية تضاعف الـ DNA وهى:

١ - تجهيز الحلزون المزدوج (Double helix) للتضاعف وذلك بانفراج الخيطين الأبويين عن بعضهما وتكوين ما يعرف بانبعاج التضاعف (Replication bubble) فى جزء من الحلزون المزدوج . ويحدث هذا الانبعاج عند تتابع معين قصير من النيوكليوتيدات يعرف بمنشأ التضاعف (Replication origin) حيث يرتبط عديد من البروتينات بهذا المنشأ (Origin) وأول بروتين يتعرف على المنشأ ويرتبط به هو البروتين البادئ (Initiator protein) ويساعد فى انجذاب هذا البروتين ونقطة المنشأ إنزيم DNA helicase كما يساعد هذا الإنزيم فى انفصال الخيطين الأبويين عن بعضهما وتكوين انبعاج التضاعف وشوكة التضاعف (Replication fork) وبذلك يستطيع إنزيم البلمرة (DNA polymerase III) استخدام الخيطين الأبويين كمطبعة (Template) لتكوين خيطين جديدين طبقاً لآلية التضاعف نصف المحافظ.

٢- يعتمد التخليق الحقيقى لخييط الـDNA الجديد على إنزيم البلمرة (DNA polymerase III) حيث يقوم بإضافة النيوكليوتيدات تلو الأخرى الى الطرف 3'-OH من خييط الـDNA النامى فى الإتجاه 5' → 3' فقط. ولكى يقوم هذا الإنزيم بهذه المهمة فإنه يحتاج الى المتطلبات التالية:

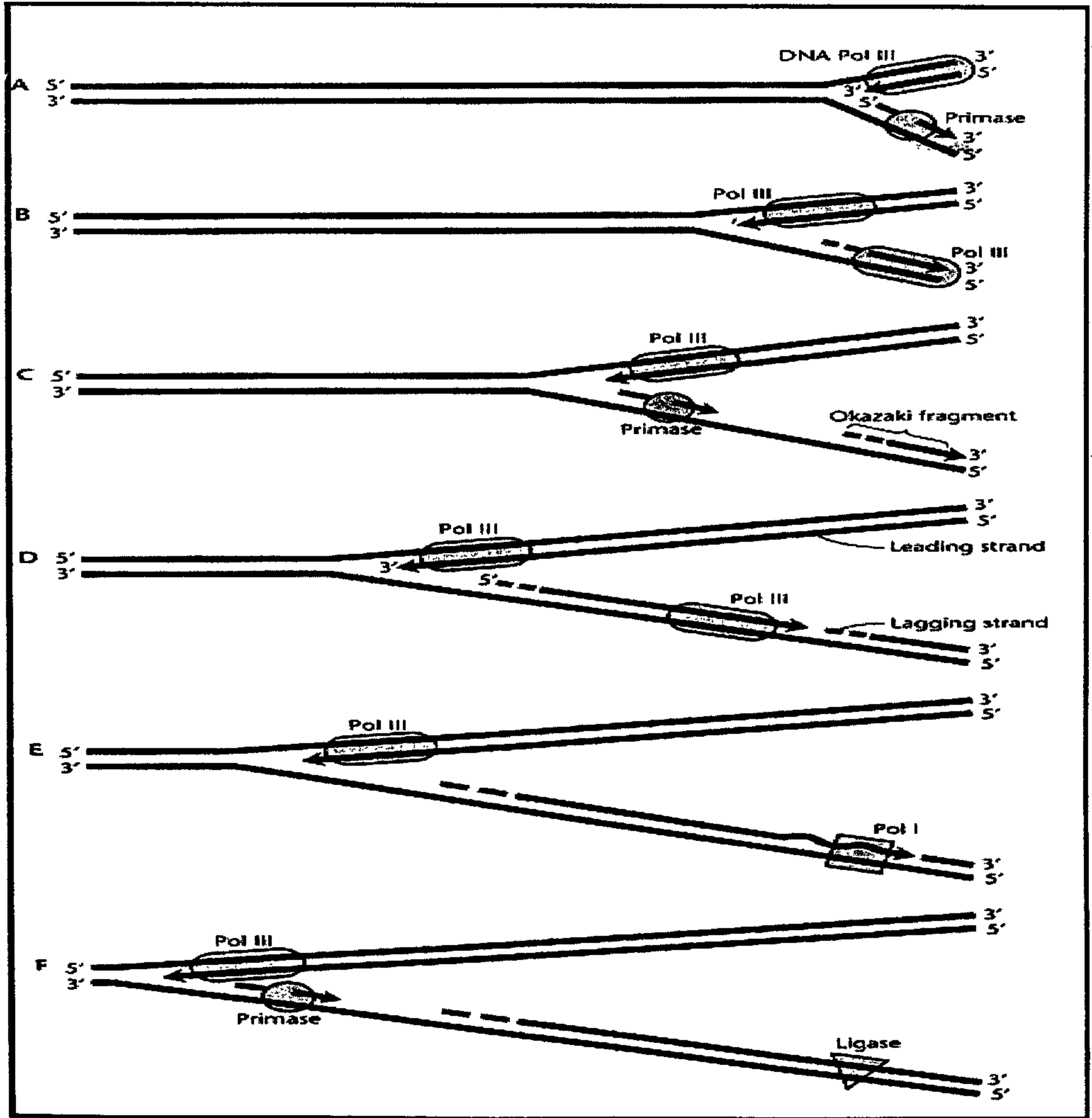
أ- أن يكون خييط الـDNA الذى يستخدمه كقالب فى صورة خييط مفرد (Single strand) وليس فى صورة جزئى مزدوج الخييط (Double strand) ويتحقق هذا المطلب بتكوين انبعاج التضاعف.

ب- أن هذا الإنزيم لا يستطيع أن يبدأ (Initiate) تخليق خييط الـDNA الجديد بنفسه حيث يحتاج الى طرف نامى (3'-OH). بالفعل يمكن أن يستخدمه لإضافة النيوكليوتيدات إليه فى الإتجاه 5' → 3' ويتحقق هذا المطلب بتخليق قطع صغيرة من الـDNA تسمى بالبادئات

(RNA primer) والتي يقوم بتخليقها إنزيم الـPrimase عند شوكة التضاعف وبذلك تقدم هذه البادئات التى تحتوى على الطرف 3'-OH الوسيلة التى يستخدمها إنزيم DNA polymerase III لبدأ تخليق خييط الـDNA الجديد فى الإتجاه 5' → 3' عن طريق وضع النيوكليوتيدات فى خييط الـDNA الجديد من خلال الاقتران بين النيوكليوتيدات المكملة (G ≡ C, A = T) فى كل من الخييط المطبعى او القالب وخييط الـDNA الجديد وتكوين الروابط الفوسفودايستر (Phosphodiester) بين هذه النيوكليوتيدات فى خييط الـDNA الجديد وتسمى هذه العملية باسم البلمرة (Polymerization).

ج- نظراً لأن إنزيم DNA polymerase III يقوم بتخليق خييط الـDNA فى الإتجاه 5' → 3' لذلك يقوم هذا الإنزيم باستخدام الخييط الأبوى الذى إتجاهه 5' → 3' كخييط مطبعى لتكوين الخييط الجديد فى الإتجاه 3' → 5' بصورة مستمرة ويعرف هذا الخييط النامى بالخييط المتقدم (Leading strand) بينما يستخدم هذا الإنزيم الخييط الأبوى الآخر الذى إتجاهه 5' → 3' كخييط مطبعى لتكوين الخييط الجديد الآخر بصورة متقطعة (Discontinuous) باستخدام قطع صغيرة من الـDNA يبلغ طولها ١٠٠٠ نيوكلوتيدة تعرف باسم قطع أوكازاكي (Okazaki fragments) نسبة الى العالم Okazaki

الذي اكتشفها ويقوم بتخليق هذه القطع الصغيرة من الـ DNA هذا الإنزيم في الإتجاه $5' \rightarrow 3'$ ويعرف هذا الخيط المتكون بصورة متقطعة بالخيط المتكلىء (Lagging strand) والذي سيكون إتجاهه بعد اكتمال تضاعفه في الإتجاه $5' \rightarrow 3'$ شكل (١٢).



شكل (١٢): يوضح آلية تضاعف الـ DNA بواسطة إنزيم DNA pol III

شرح شكل (١٢)

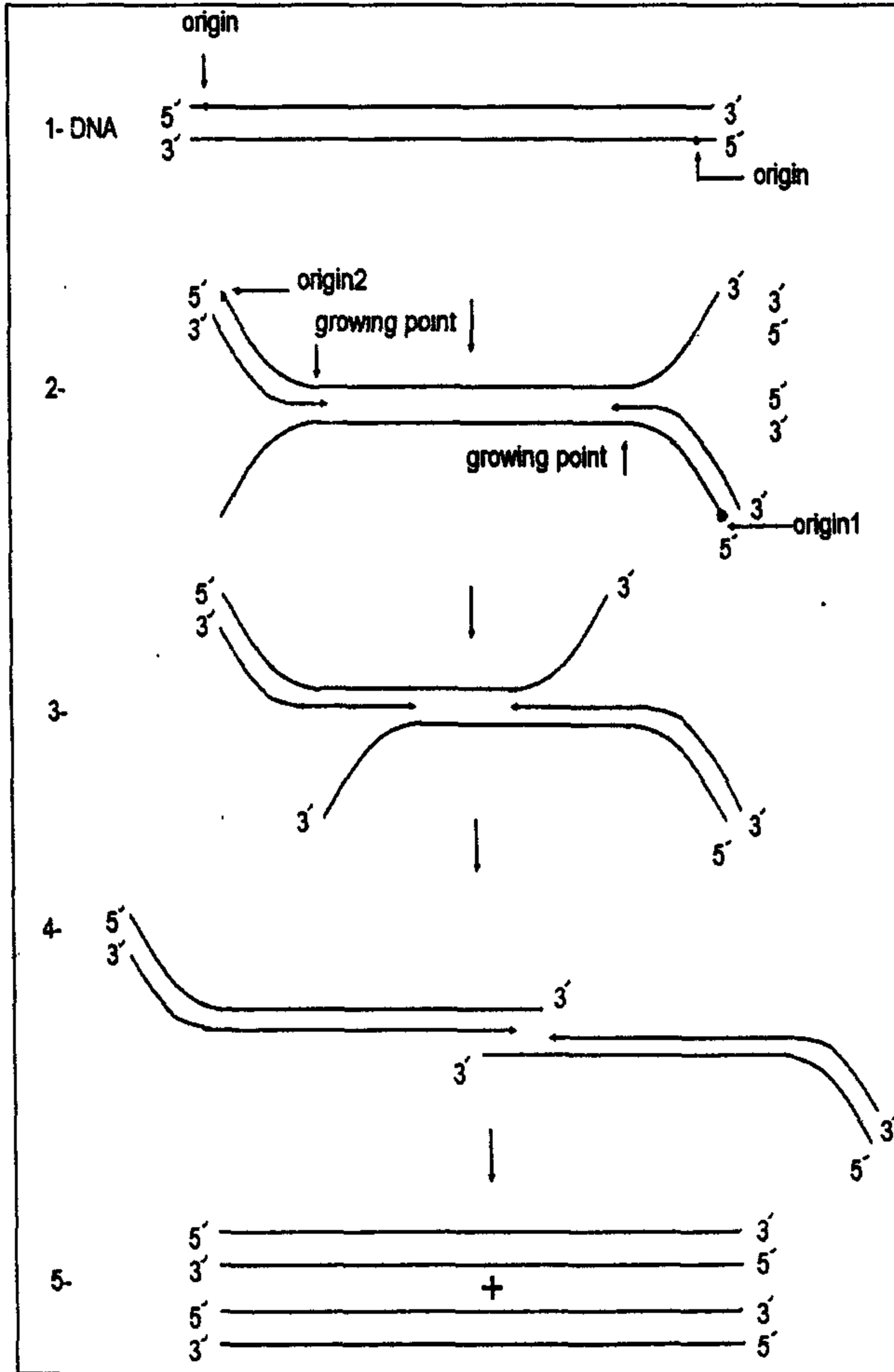
يقوم إنزيم DNA pol III بتخليق الخيط الجديد المتقدم (Leading strand) بصورة مستمرة في الإتجاه $3' \leftarrow 5'$ بينما يقوم بتخليق الخيط الجديد المتكسّر (Lagging strand) بصورة منقطعة في الإتجاه $5' \leftarrow 3'$ باستخدام قطع من الـ DNA تسمى بقطع اوказاكى (Okazaki fragments).
يقوم إنزيم البلمرة DNA polymerase I بوظيفتين احدهما إزالة البادئات (RNA primers) عن طريق كسر الرابطة الفوسفودايستر (Phosphodiester) بين البادئ (RNA primer) وقطع اوказاكى وفي نفس الوقت يقوم بالوظيفة الثانية وهي إحلال قطع من الـ DNA بدلا من البادئ من خلال الاقتران بين النيوكليوتيدات المكملة في كل من الخيط المطبعي وخيط الـ DNA الجديد ($G \equiv C$, $A = T$).
يقوم إنزيم الـ DNA ligase بوصل أو لحم (Seals) قطع اوказاكى مع بعضها وكذلك الفجوات الأخرى الناشئة من إزالة البادئ واحلالها بقطع من الـ DNA من خلال تكوين الرابطة فوسفودايستر وبذلك يتكون خيطين جديدين كاملين من الـ DNA.

وبالأخذ في الاعتبار هذه النقاط السابقة وطبيعة جزيء الـ DNA سواء كان خيطي (Linear DNA) أو دائري (Circular DNA) وضعت عديد من الآليات (Mechanisms) لتضاعف جزيء الـ DNA وهي علي النحو التالي :

أولاً: آلية التضاعف المستمر أحادي الإتجاهUnidirectional Continuous Mechanism

وفي هذه الآلية يوجد نقطتين لمنشأ التضاعف (Replication origin) عند طرفي جزيء الـ DNA يوضع عندهما البادئات (RNA primers) التي يستخدمها إنزيم الـ DNA polymerase III لتكوين خيطين جديدين ابتداء من نقاط المنشأ (Origin) حيث يستخدم الخيط الأبوي الذي إتجاهه $5' \leftarrow 3'$ لتكوين الخيط الجديد في الإتجاه $3' \leftarrow 5'$ وبصورة مستمرة كما يستخدم الخيط الأبوي الآخر الذي إتجاهه $3' \leftarrow 5'$ أيضاً لتكوين خيط الـ DNA الجديد الآخر في الإتجاه $5' \rightarrow 3'$ وبصورة مستمرة أيضاً طبقاً لآلية التضاعف نصف المحافظ وبذلك يتم تخليق الخيطين الجديدين من

الـ DNA بصورة مستمرة وفي إتجاه واحد (Unidirectional) من نقطى المنشأ عند طرفى الـ DNA (شكل ١٣) . ويتضاعف بهذه الآلية جزئيات الـ DNA الفيرسية الخطية (Linear DNA) مثل الـ Adenovirus حيث يعمل طرفى الـ DNA كنقاط منشأ (Origin) يبدأ منهما التضاعف وتخليق خيطين جديدين من الـ DNA بصورة مستمرة وفي إتجاه واحد من نقطتى المنشأ.



شكل (١٣): آلية التضاعف المستمر
أحادى الإتجاه

Unidirectional continuous mechanism

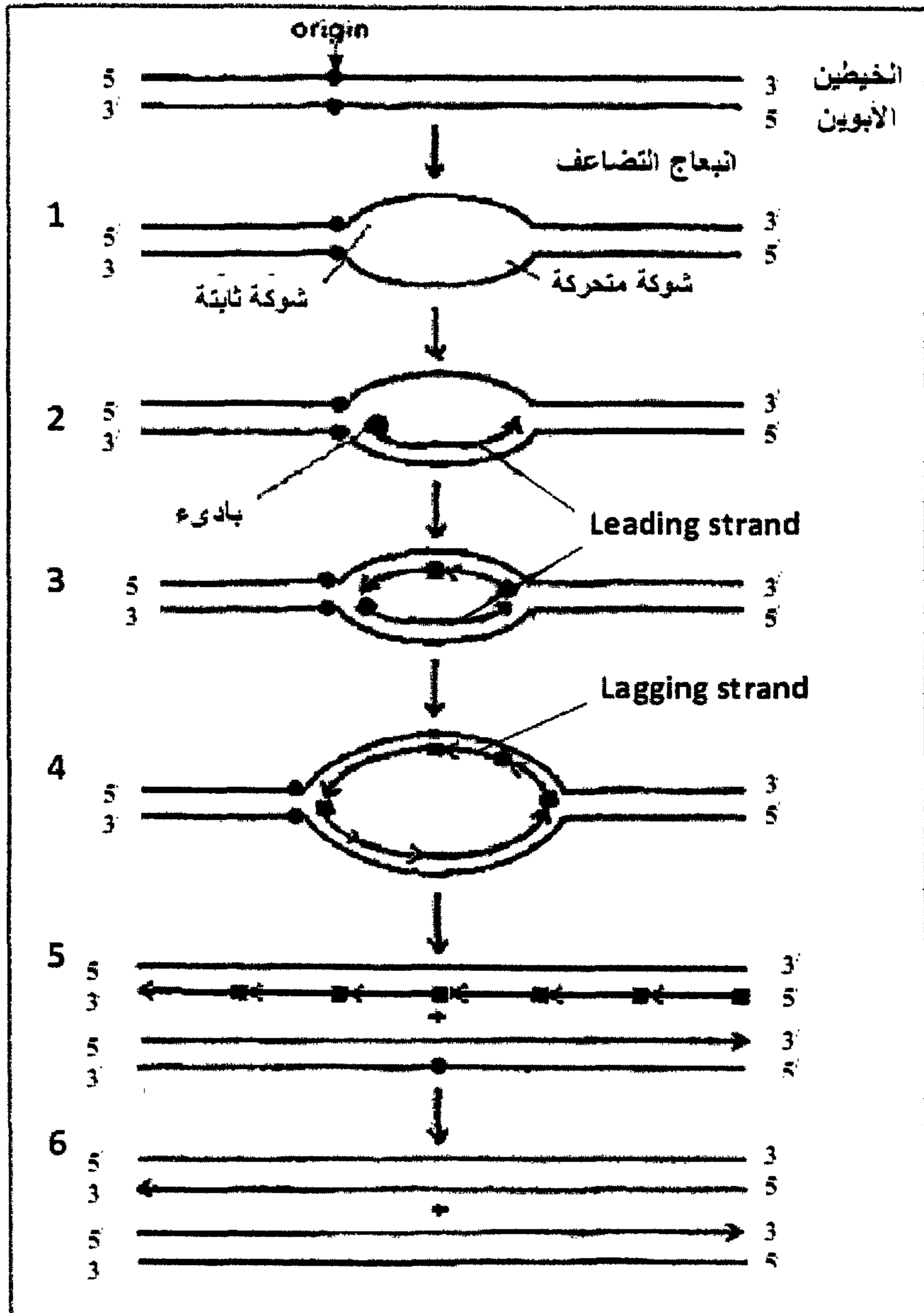
١- الحلزون المزدوج الأبوى الذى يحتوى على نقطتين لمنشأ origin التضاعف عند طرفى الخيطين الأبويين.

٢- انفصال الخيطين الأبويين عن بعضهما عند الطرفين وابتداء تخليق الخيطين الجديدين فى الإتجاه 3' ← 5' بصورة مستمرة كما فى الخطوات الثالثة والرابعة.

٥- انتهاء تخليق الخيطين الجديدين وتكوين حلزونين مزدوجين من الـ DNA تحتوى كل منهما على خيط أبوى وخيط جديد طبقاً لتضاعف الـ DNA نصف المحافظ.

ثانيا: آلية التضاعف نصف المتقطع احادي الاتجاهUnidirectional Semidiscontinuous Mechanism

وفي هذه الآلية يوجد نقطة منشأ (Origin) واحدة يتكون عندها انبعاث التضاعف وشوكتين (2 Forks) للتضاعف علي جانبي الانبعاث احدهما شوكة ثابتة (Stationary fork) ملاصقة لنقطة المنشأ والاخري متحركة (Moving fork) علي الجانب الآخر من الانبعاث ويحدث تخليق خيطي الـ DNA الجديدين بهذه الآلية باستخدام إنزيم DNA polymerase III البادئات (RNA primers) في الإتجاه $3' \leftarrow 5'$ حيث يستخدم الخيط الأبوي الذي إتجاهه $3' \leftarrow 5'$ لتكوين الخيط المتقدم (Leading strand) بصورة مستمرة كلما تقدمت شوكة التضاعف المتحركة بعيدا عن نقطة المنشأ وكذلك يستخدم هذا الإنزيم الخيط الابوي الذي إتجاهه $5' \leftarrow 3'$ كمطبعة لتكوين الخيط الجديد المتلكئ (Lagging strand) بصورة متقطعة في الإتجاه $3' \leftarrow 5'$ بواسطة قطع او كازاكي كلما تقدمت شوكة التضاعف المتحركة بعيدا عن نقطة المنشأ . وبهذه الآلية يتم تخليق الخيط المتقدم بصورة مستمرة بينما يتم تخليق الخيط المتلكئ بصورة متقطعة في إتجاه واحد (Unidirectional) من نقطة المنشأ (Origin) ويتضاعف بهذه الآلية البلازميدات البكتيرية (شكل ١٤).



شكل (١٤) : يوضح آلية التضاعف نصف المنقطع أحادى الإتجاه

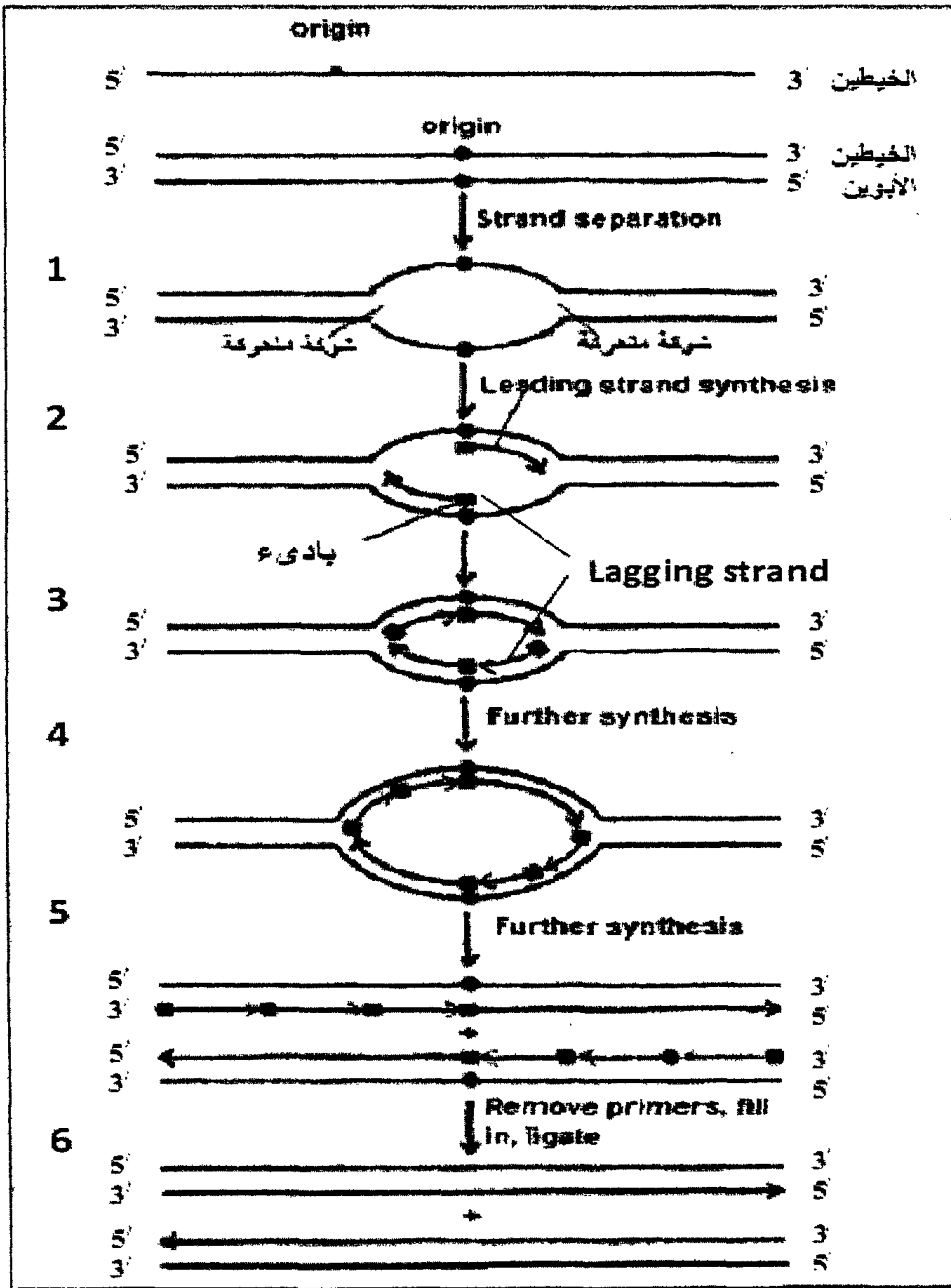
Unidirectional semi discontinuous mechanism

شرح شكل (١٤)

- ١- انفصال الخيطين الأبويين عند نقطة المنشأ (Origin) وتكوين انبعاث التضاعف وشوكتي (2 Forks) التضاعف أحدهما ثابتة وهي القريبة من نقطة المنشأ والأخرى متحركة.
- ٢- تخليق خيط الـ DNA الجديد المتقدم (Leading strand) في الإتجاه $3' \leftarrow 5'$ بصورة مستمرة.
- ٣- تخليق خيط الـ DNA الجديد المتكسّر (Lagging strand) في الإتجاه $3' \leftarrow 5'$ بصورة منقطعة.
- ٤- حركة شوكة التضاعف (Fork) المتحركة بعيداً عن نقطة المنشأ واستمرار التخليق في كلا الخيطين الجديدين بصورة مستمرة في الخيط الجديد المتقدم وبصورة منقطعة في الخيط الجديد المتكسّر.
- ٥- انتهاء تخليق الخيطين الجديدين داخل انبعاث التضاعف.
- ٦- إزالة البائدات (RNA primer) وملأ الفجوات والتحامها وبذلك يتكون حلزون مزدوج من الـ DNA كل منهما يحتوى على خيط أبوي وخيط جديد طبقاً للتضاعف نصف المحافظ.

ثالثاً: آلية التضاعف نصف المتقطع ثنائي الإتجاهBidirectional Semidiscontinuous Mechanism

وفي هذه الآلية يبدأ التضاعف من نقطة منشأ (Origin) واحده ويتكون انبعاث التضاعف وكذلك شوكتي التضاعف (2 Fork) علي جانبي الانبعاث وتتحركان في الإتجاهين المتضادين (Bidirectional) من نقطة المنشأ (شكل ١٥). وفي هذه الآلية يقوم إنزيم الـ DNA polymerase III بتخليق الخيط المتقدم بصورة مستمرة علي يمين نقطة المنشأ وبصورة منقطعة علي شمال نقطة المنشأ بينما يقوم الإنزيم بتكوين الخيط المتكسّر بصورة مستمرة علي شمال نقطة المنشأ وبصورة منقطعة علي يمين نقطة المنشأ في الإتجاه $5' \rightarrow 3'$ في كلا الخيطين الجديدين مستخدماً الخيط المطبعي الأبوي الذي إتجاهه $3' \rightarrow 5'$ كمطبعة لتكوين الخيط المتقدم الذي إتجاهه $5' \rightarrow 3'$ بينما يستخدم الخيط الأبوي الآخر الذي إتجاهه $5' \rightarrow 3'$ لتخليق الخيط الجديد المتكسّر الذي إتجاهه $5' \rightarrow 3'$. ولقد أكدت الأبحاث أن هذه الآلية لتضاعف الـ DNA تحدث في الكائنات حقيقية النواة (Eukaryotes) والكائنات غير حقيقية النواة (Prokaryotes) ذات الكروموسومات الطولية (Linear chromosome).



شكل (١٥) : آلية التضاعف نصف المنقطع ثنائي الإتجاه

Bidirectional semi discontinuous mechanism

شرح شكل (١٥)

- ١- انفصال الخيطين الأبويين عند نقطة المنشأ (Origin) وتكوين انبعاث التضاعف وشوكتي (2 Forks) التضاعف المتحركتان بعيداً عن نقطة المنشأ.
- ٢- تخليق الخيط الجديد المتقدم (Leading) في الاتجاه $3' \leftarrow 5'$ يمين نقطة المنشأ وتخليق الخيط الجدي المتكلىء (Lagging) في الاتجاه $3' \leftarrow 5'$ بصورة مستمرة شمال نقطة المنشأ.
- ٣- استمرار تخليق الخيط الجديد المتقدم بصورة مستمرة يمين نقطة المنشأ وبصورة منقطعة شمال نقطة المنشأ وكذلك استمرار تخليق خيط الـ DNA الجديد المتكلىء بصورة مستمرة شمال نقطة المنشأ وبصورة منقطعة يمين نقطة المنشأ.
- ٤ ، ٥ - استمرار التخليق في كلا الخيطين الجديين بنفس الآلية السابقة حتى إنتهاء التضاعف داخل انبعاث التضاعف.
- ٦- إزالة البائدات (RNA primers) وملا الفجوات والتحامها وبذلك يتكون حلزونين مزدوجين كل منهما يحتوى على خيط أبوى وخيط جديد.

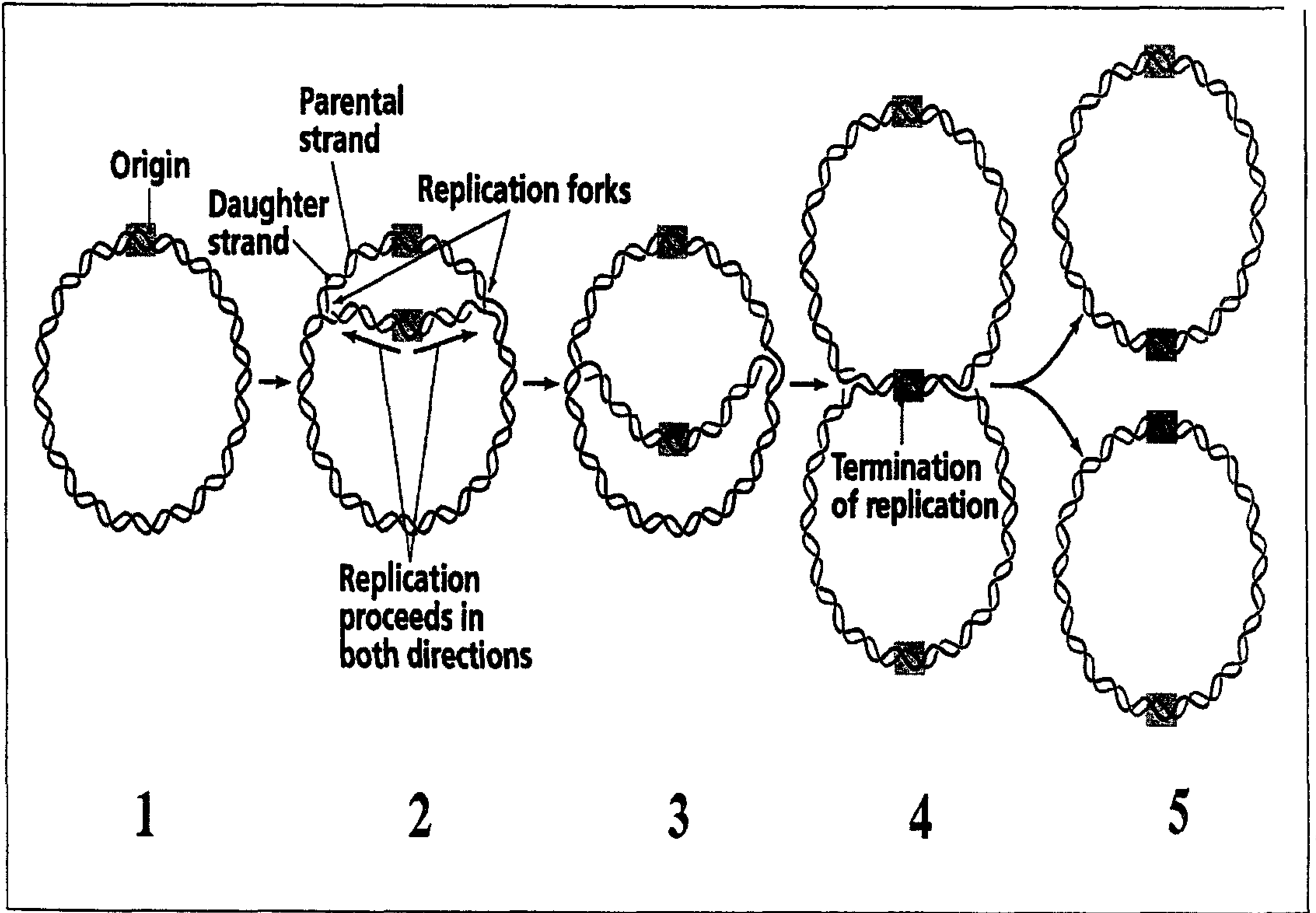
رابعاً: آلية التضاعف المستمر ثنائى الإتجاهBidirectional continous mechanism

وتحدث هذه الآلية في جزئيات الـ DNA البكتيرية الدائرية (Circular DNA) وكذلك البلازميدات البكتيرية الدائرية وبعض الفيروسات حيث تكفى نقطة منشأ (Origin) واحدة ينفصل عندها الخيطين الأبويين عن بعضهما وتكوين شوكتي (2 forks) التضاعف على جانبي الانبعاث ثم يقوم إنزيم الـ DNA polymerase III باستخدام الخيطين الأبويين الدائريين كمطبعة لتكوين خيطيين جديدين دائريين فى الإتجاه $5' \rightarrow 3'$ وبصورة مستمرة على طول شوكتي التضاعف فى الإتجاهيين المتضادين من نقطة المنشأ حتى ينتهى تضاعف الـ DNA الدائرى وتكوين خيطين جديدين طبقاً لآلية التضاعف نصف المحافظ (شكل ١٦).

ويستخدم اصطلاح ريبليكون (Replicon) ليشير الي الوحدة التضاعفية (Replication unit) التي تضم منشأ التضاعف وانبعاج التضاعف وشوكتي التضاعف حيث تستخدم هذه المكونات في تخليق خيط الـ DNA المتقدم وكذلك خيط الـ DNA المتكلى سواء كان التضاعف احادي الإتجاه (Unidirectional) او ثنائي الإتجاه (Bidirectional) من نقطة المنشأ (Origin) باستخدام الإنزيمات التالية :

- ١- إنزيم DNA helicase الذي يساعد في ارتباط البروتين البادىء بنقطة المنشأ (Origin) وكذلك انفصال الخيطين الابويين عن بعضهما وتكوين انبعاج التضاعف الذي يتم بداخله تخليق الخيطين الجديدين من الـ DNA .
 - ٢- إنزيم الـ Primase والذي يقوم بتخليق البادئات (RNA primers) والتي يستخدمها إنزيم الـ DNA polymerase III لبدأ تخليق خيطي الـ DNA الجديدين .
 - ٣- إنزيم الـ DNA polymerase III والذي يقوم بتخليق الخيطين الجديدين من الـ DNA في الإتجاه $5' \rightarrow 3'$ باستخدام الخيطين الأبويين.
 - ٤- إنزيم الـ DNA polymerase I والذي يقوم بإزالة البادئات (RNA primers) وإحلالها بقطع من الـ DNA
 - ٥- إنزيم الـ DNA ligase والذي يقوم بوصل او لحم (Seals) قطع اوكازاكي ببعضها عن طريق تكوين الروابط الفوسفودايستر بين هذه القطع وكذلك تكوين هذه الروابط بين قطع الـ DNA التي حلت محل البادئات (RNA primers) في خيط الـ DNA المتكون.
- وفي الكائنات حقيقة النواة (Eukaryotes) ذات الكروموسومات الطويلة يتضاعف جزئيات الـ DNA بها عن طريق عديد من الريبليكونات (Multiriplicons) وذلك لاحتوائها علي عديد من نقاط المنشأ (Multiorigins) والتي يبدأ منها التضاعف في كل ريبليكون (Replicon) بصورة مستقلة عن الآخر حيث شوهد بالميكروسكوب الاليكتروني عديد من الانبعاجات في الكروموسوم الواحد أثناء تضاعفه وبتقدم تضاعف هذه الريبليكونات (Replicons) العديدة في تضاعفها تتصل ببعضها في النهاية ويكتمل بذلك تضاعف الـ DNA الطويل في هذه الكروموسومات الطويلة .

بينما في الكائنات غير حقيقية النواة (Prokaryotes) مثل البكتيريا يتم تضاعف الكروموسوم البكتيري المفرد في صورة ريبليكون واحد (Single replicon) وذلك لاحتوائه علي نقطة منشأ (Origin) واحدة والتي منها يبدأ التضاعف وتكوين انبعاث التضاعف وشوكتي التضاعف واللذان تتحركان في إتجاهين متضادين (Bidirectional) من نقطة المنشأ (Origin) وبصورة مستمرة في كلا الإتجاهين من نقطة المنشأ وعلي ذلك يتضاعف الكروموسوم البكتيري بآلية التضاعف المستمر ثنائي الإتجاه (Bidirectional continuous replication)



شكل (١٦) : يوضح آلية التضاعف المستمر ثنائي الإتجاه

Bidirectional continuous mechanism

شرح شكل (١٦)

- ١- الحلزون المزدوج من الـ DNA الدائرى الذى يحتوى على نقطة منشأ (Origin) للتضاعف واحدة.
- ٢- انفصال الخيطين الأبوين الدائريين عن بعضهما وتكوين انبعاث التضاعف وشوكتى (2 Forks) التضاعف المتحركتان فى الإتجاهين من نقطة المنشأ وامتداد تخليق الخيطين الجديدين فى الإتجاه $3' \leftarrow 5'$ بصورة مستمرة.
- ٣- استمرار حركة شوكتى التضاعف بعيداً عن نقطة المنشأ واستمرار تخليق الخيطين الجديدين بين الدائريين بصورة مستمرة فى الإتجاه $3' \leftarrow 5'$.
- ٤- استمرار حركة شوكتى التضاعف فى الإتجاهين بعيداً عن نقطة المنشأ واستمرار تخليق الخيطين الجديدين الدائريين بصورة مستمرة.
- ٥- انتهاء التضاعف وتكوين حلزونين مزدوجين دائريين من الـ DNA.

الباب الثانى

الجينات

The Genes

مفهوم الجين Gene Concept

من وجهة النظر الكلاسيكية أو التقليدية تحتل الجينات مواقع محددة على الكروموسومات ومع ذلك يمكن تعريف الجين بأى من المفاهيم التالية:

- ١- الجين هو وحدة إعادة تكوين التراكيب الوراثية (Recombinational unit) ويشير هذا المفهوم الى أن الجينات تمثل مواقع محددة وثابتة على الكروموسومات والتي يمكن أن تتفصل عن بعضها عن طريق العبور (Crossingover) وتكوين تراكيب وراثية جديدة ويمكن تحديد مواقع الجينات المرتبطة على الكروموسومات باستخدام بعض الطرق الوراثية.
- ٢- الجين هو وحدة الوظيفة (Functional unit) ويشير هذا المفهوم الى أن الجين يكون مسئولاً عن تكوين شكل مظهرى (Phenotype) معين ويجب أن يقوم الجين بهذه الوظيفة فى كل الخلايا التى يجب أن يظهر فيها هذا الشكل المظهرى.
- ٣- الجين هو وحدة الطفرور (Mutational unit) ويشير هذا المفهوم الى أن الجين يمكن أن يطرر وذلك بحدوث تغير مستديم فى الجين والذى يعرف بالطفرة وهذا التغير المستديم فى الجين (الطفرة) يورث الى النسل.

ومع ذلك فإن هذه المفاهيم الثلاثة لتعريف الجين ليس من الضرورى أن تشير الى نفس الوحدة التركيبية (Unit of structure) فعلى سبيل المثال يرجع التغير فى بروتين الجلوبيين الطافر عن الجلوبيين الطبيعى الى حدوث تغير فى زوج واحد من القواعد فى جين الجلوبيين الطافر. ويتركب بروتين الجلوبيين الطبيعى من سلسلتين ألفا (2α chain) عديدة الببتيد متماثلتين يتركب كل منها من ١٤١ حامض أمينى و سلسلتين بيتا (2β chain) عديدة الببتيد متماثلتين يتركب كل منها من ١٤٦ حامض أمينى.

بينما يتركب بروتين الجلوبيين الطافر من نفس التركيب السابق مع إحلال الحامض الأمينى فالين السادس فى السلسلة β لبروتين الجلوبيين الطافر محل الحامض الأمينى الجلوتاميك فى بروتين الجلوبيين الطبيعى ووجد أن الشفرة الوراثية (Genetic code) للحامض الأمينى الجلوتاميك هى GAG بينما الشفرة الوراثية للفالين هى GTG وتختلف الشفرتان عن بعضهما فى إحلال زوج واحد من القواعد. وهذا يؤكد أن مفهوم الجين كوحدة وظيفة أو وحدة إعادة تكوين تراكيب وراثية أو وحدة طفور لا يشير الى نفس الوحدة التركيبية مما دعا العلماء النظر مرة أخرى للجين بصورة أكثر دقة من حيث المفاهيم الثلاثة سابقة الذكر.

وقبل التطرق لمعرفة التركيب الدقيق للجين يجب الإشارة الى الاختبار العملى الذى يستخدم فى تحديد التركيب الدقيق للجين وهو اختبار التكامل (Complementation test) أو اختبار التجاذب والتنافر (Cis / Trans test) ويجرى هذا الاختبار لتحديد وقوع طفرتين متتحييتين (m_2) فى نفس الجين بمعنى أنها طفرات أليلية (Allelic) أو وقوعهما فى جينين مختلفين بمعنى أنها طفرات غير أليلية (Non-allelic). وبافتراض أن الطفرتين المتتحييتين هما m_1 و m_2 فإن وضع الطفرتين على الكروموسومين المتماثلتين (Homologous chromosomes) يصبح فى صورة من الصورتين التاليتين:

١- إما أن تقع الطفرتان المتتحييتين m_1 , m_2 على نفس الكروموسوم وتقع الأليلات الطبيعية m_1^+ , m_2^+ على الكروموسوم المماثل ويعرف بالوضع التجاذبى (Cis position) كما يلى:

$$\begin{array}{cc} m_1 & m_2 \\ \hline m_1^+ & m_2^+ \end{array}$$

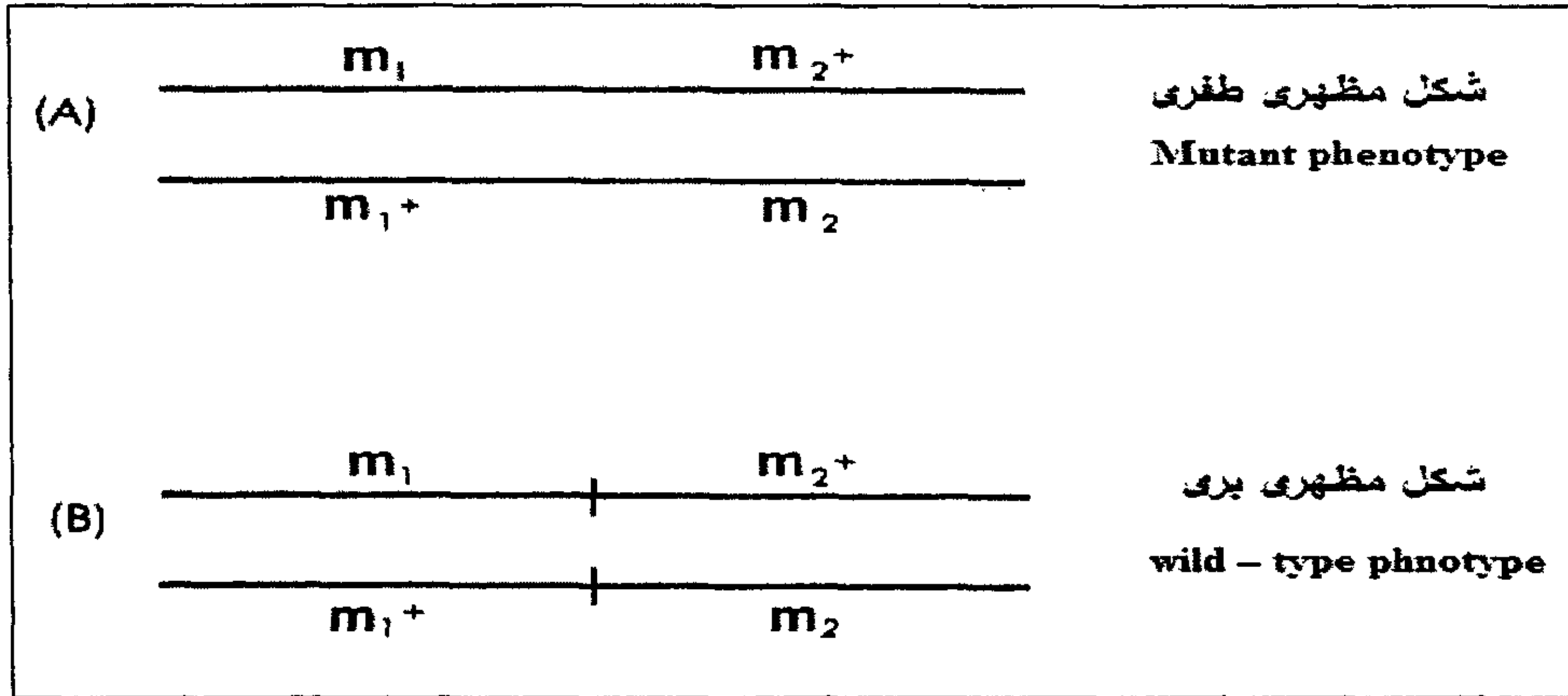
٢- أو أن تقع إحدى الطفرتين على أحد الكروموسومين المتماثلين وتقع الطفرة الأخرى على الكروموسوم الآخر ويعرف بالوضع التنافرى (Trans-position) كما يلى:

$$\begin{array}{cc} m_1 & m_2^+ \\ \hline m_1^+ & m_2 \end{array}$$

وتعتمد الفكرة الأساسية التى بنى عليها هذا الاختبار العملى على الحقيقة العلمية الراسخة وهى أن الجين من الناحية الوظيفية ينسخ (Transcription) ويترجم (Translation) الى نوع واحد من السلاسل عديدة الببتيد (Polypeptide chain)

One Gene \longrightarrow One polypeptide chain

فإذا كانت الطفرتين المتحيتين m_1 , m_2 تقعان فى نفس الجين أى أنها طفرات أليليه (Allelic) يكون الشكل المظهرى للفرد الخليط فى الطفرتين ذو مظهر طفرى (Mutant type) وذلك لعدم حدوث التكامل بين الطفرتين، بينما إذا كانت الطفرتين تقعان فى جينين مختلفين يكون الشكل المظهرى للفرد الخليط فى الطفرتين ذو مظهر برى وذلك لحدوث التكامل (Complementation) بين الطفرتين (شكل ١٧)



شكل (١٧): يوضح اختبار التكامل للفرد الخليط فى الطفرتين فى الوضع التنافرى (Trans position)

- (A) إذا كانت الطفرتين m_1 , m_2 فى نفس الجين (طفرات أليليه) فإنه لا يحدث تكامل ويكون الشكل المظهرى للفرد الخليط والحامل للطفرتين ذو شكل مظهرى طفرى (Mutant type) .
- (B) إذا كانت الطفرتين m_1 , m_2 فى جينين مختلفين (طفرات غير أليليه) فسوف يحدث تكامل بينهما ويكون الشكل المظهرى للفرد الخليط للطفرتين ذو شكل مظهرى برى (Wild- type).

شروط إجراء هذا الاختبار

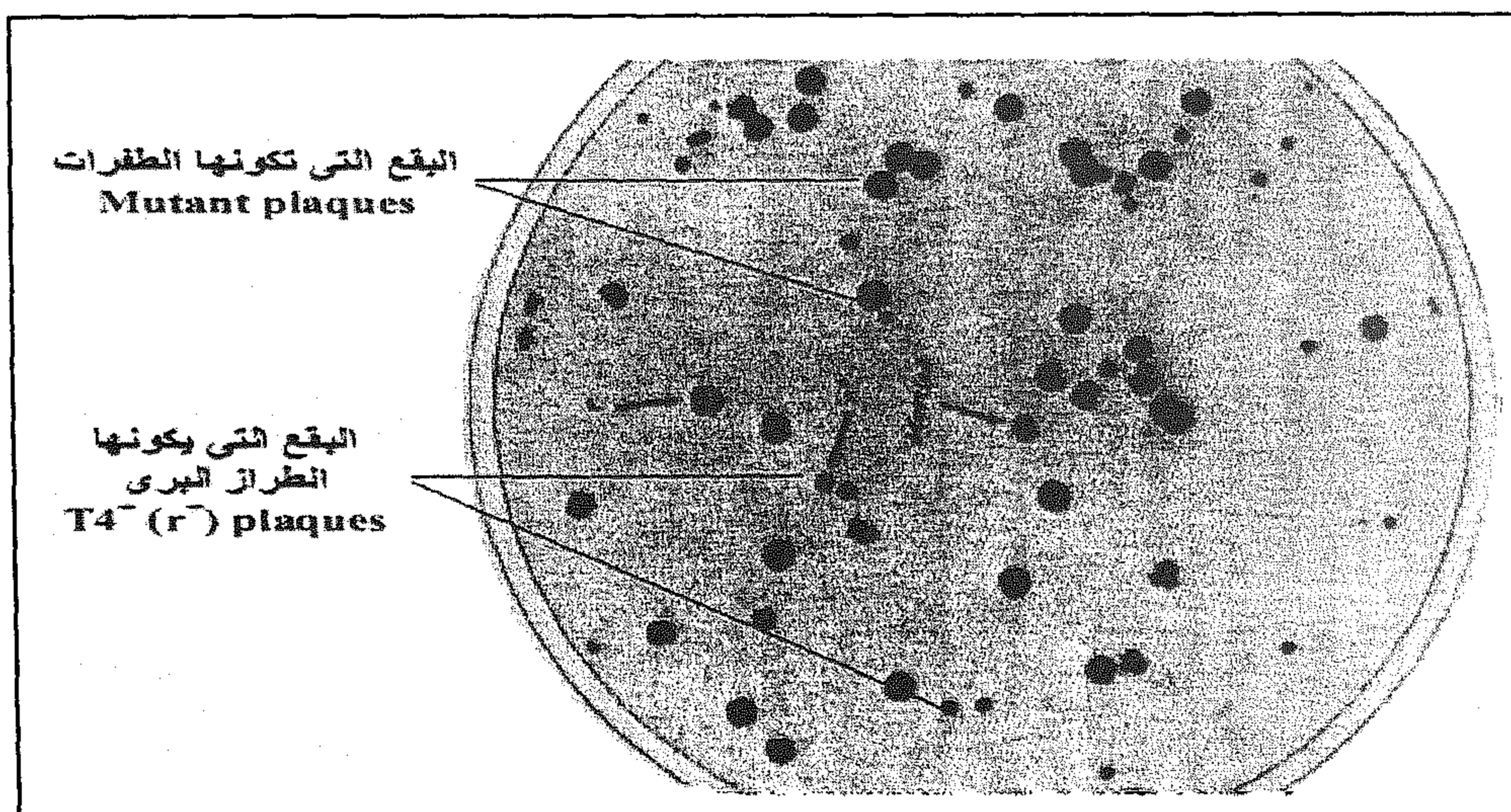
- ١- أن يكون الكائن تحت الدراسة ثنائى (Diploid) للطفرتين .
 - ٢- أن يكون الكائن تحت الدراسة خليط (Heterozygous) للطفرتين .
 - ٣- أن تكون الطفرتان تحت الدراسة فى الوضع التنافرى (Trans-position) .
- ويمكن إجراء هذا الاختبار من الناحية العملية فى الكائنات الراقية الثنائية عن طريق التهجين بين الطفرتين للحصول على نسل الجيل الأول F_1 وتحليل النسل الناتج فإذا كان النسل الناتج من تهجين الطفرتين m_1, m_2 ذو مظهر طفرى (Mutant type) فإن ذلك يدل على أن الطفرتين تقعان فى نفس الجين أما كان النسل الناتج من تهجين الطفرتين m_1, m_2 ذو مظهر برى فإن ذلك يدل على أن الطفرتين تقعان فى جينين مختلفين.
- ويمكن أيضاً تطبيق هذا الاختبار على الطفرات التى تحدث فى البكتريوفاج (Bacteriophage) عن طريق العدوى المختلطة (Mixed infection) للطفرتين فى نفس الوقت للخلايا البكتيرية العائلة وبذلك يتحقق شروط هذا الاختبار سابقة الذكر.

التركيب الدقيق للجين Fine structure of the Gene

فى منتصف الستينات من القرن العشرين قام العالم Seymour Benzer بإجراء تحليل وراثى لجين فى البكتريوفاج T_4 مقدماً بذلك أول صورة حقيقية عن التركيب الدقيق للجين. فعندما يهاجم البكتريوفاج البرى (Wild-type T_4) البكتيريا *E. coli* فإنه يتكاثر بداخل الخلايا البكتيرية وفى النهاية يحللها ويتحرر حوالى ٣٠٠ جزئ فيرسى جديد لكل خلية بكتيرية مسبباً ذلك تكوين مساحة رائقة فى البيئة الغذائية لا تحتوى على أى خلايا بكتيرية ولكنها تحتوى فقط على جزيئات فيرسية (T_4) من الطراز البرى وهذه المساحات الرائقة أو البقع المتكونة سميت باسم (Plaques). ولقد وجد بنزر Benzer أن الطراز البرى من البكتريوفاج T_4 (T_4^+) يأخذ عدة ساعات من مهاجمته للبكتيريا *E. coli* لتكوين هذه البقع (Plaques) ويعتبر تكون هذه البقع هو الشكل المظهرى (Phenotype) الذى يكونه الطراز البرى من البكتريوفاج (T_4^+) عند مهاجمته للبكتيريا *E. coli* وتتميز هذه البقع بأنها صغيرة الحجم وذات حواف متعرجة (شكل ١٨).

ولقد قام بنزر (Benzer) بدراسة طفرات فى البكتريوفاج والقادرة على إحداث تحلل سريع (Rapid lysis) للبكتيريا *E. coli* فى حوالى ٢٠ دقيقة من العدوى ووجد أن هذا التحلل السريع للبكتيريا يترتب عليه تكون بقع كبيرة الحجم وذات حواف مستوية ويعتبر تكون مثل هذه البقع هو الشكل المظهرى الذى تكونه الطفرات عند مهاجمتها للبكتيريا *E. coli* (شكل ١٨).

ولقد استخدم بنزر (Benzer) نوع معين من هذه الطفرات التى تسبب التحلل السريع للبكتيريا *E. coli* وسميت هذه الطفرات باسم rII mutants حيث يمكنها أن تنمو وتتكاثر تحت ظروف بيئية معينة ولا تنمو ولا تتكاثر تحت ظروف بيئية أخرى حيث وجد أن هذا القسم من الطفرات يمكنها أن تتكاثر داخل السلالة B ولكنها لا تستطيع أن تتكاثر داخل خلايا السلالة k_{12} من البكتيريا *E. coli*، ومثل هذا الاختلاف فى تكاثر هذه الطفرات rII mutants فى أى من السلالتين البكتيريتين B , k_{12} سمح لبنزر (Benzer) من مشاهدة وتحليل بعض الأحداث الوراثية نادرة الحدوث .



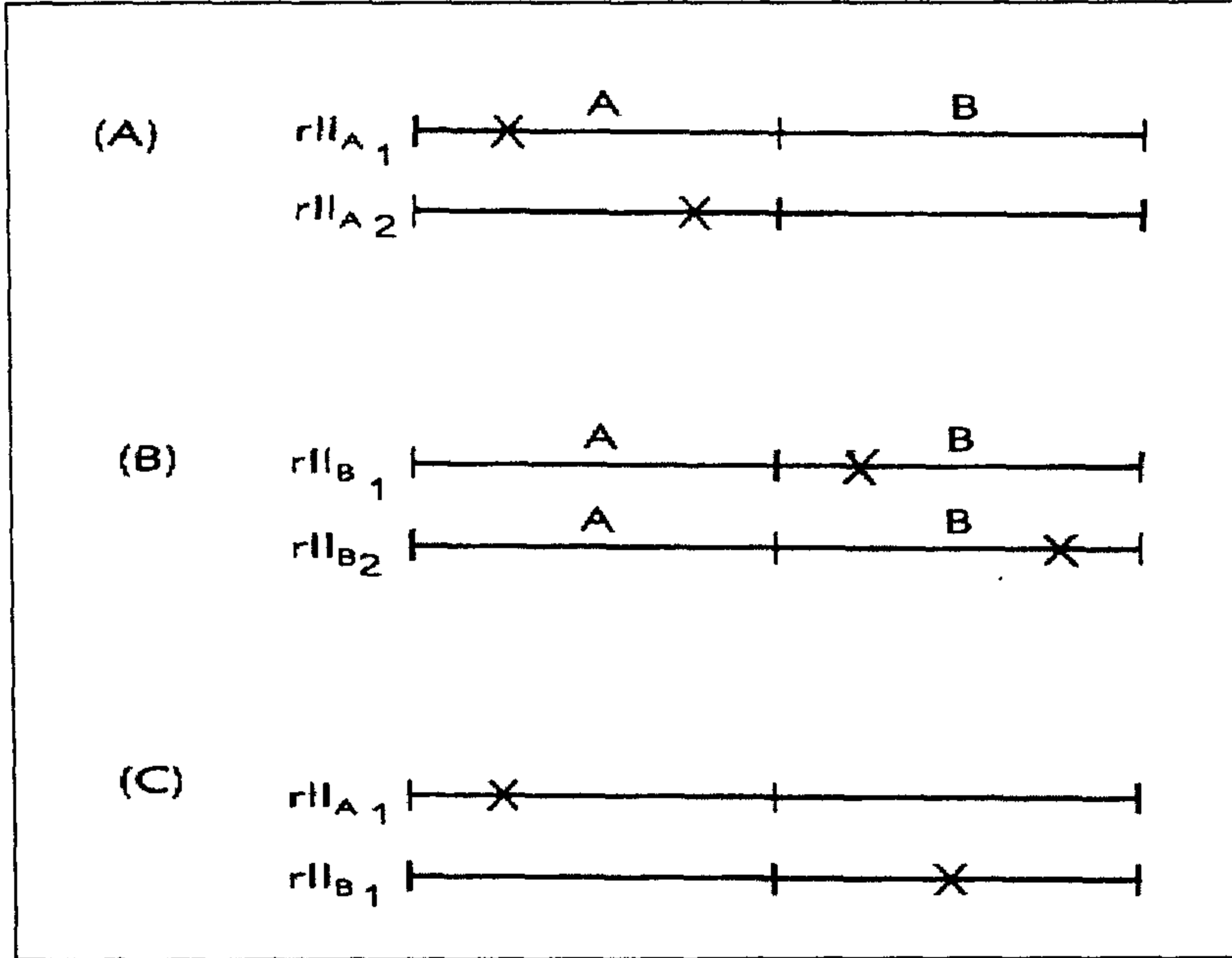
شكل (١٨) : يوضح الشكل المظهرى للبقع (Plaques) الناتجة من تحلل (lysis) البكتيريا بواسطة البكتريوفاج T_4 حيث تمثل البقع الصغيرة الشكل المظهرى الناتج من مهاجمة الطراز البرى من الفيرس (r^+) للبكتيريا بينما تمثل البقع الكبيرة الشكل المظهرى للطفرات (r^-).

السسترون The cistron

استطاع بنزر (Benzer) عزل حوالى ٢٠٠٠ طفرة من هذه الطفرات (rII mutants) التى تحدث فى البكتريوفاج T_4^+ وتسبب التحلل السريع وكل هذه الطفرات لها نفس الشكل المظهرى من حيث تكونها لبقع (Plaques) كبيرة الحجم عند تكاثرها داخل السلالة B وعدم مقدرتها على التكاثر داخل خلايا السلالة k_{12} من البكتيريا *E. coli*. ولقد تساعل بنزر (Benzer) هل كل هذه الطفرات (rII mutants) تشمل نفس الوظيفة بمعنى أنها تقع فى نفس الجين وبالتالي تكون أليلات متعددة (Multiple alleles) بنفس الجين أو أنها تقع فى جينات مختلفة. وللإجابة على ذلك السؤال استخدم عدم مقدرة هذه الطفرات على التكاثر داخل خلايا السلالة k_{12} من البكتيريا *E. coli* وكذلك استخدام اختبار التكامل. ولذلك قام بنزر (Benzer) بإجراء العدوى المختلطة (Mixed infection) باستخدام أى طفرتين من هذه الطفرات (rII mutant) والتى تسبب التحلل السريع فى عدوى خلايا السلالة البكتيرية k_{12} فى نفس الوقت. وأوضحت نتائج العدوى المختلطة لخلايا السلالة البكتيرية k_{12} أنه على الرغم من أن هذه الطفرات لا تستطيع التكاثر داخل الخلايا البكتيرية للسلالة k_{12} إلا أنه شاهد ولاحظ أن بعض التوافيق بين طفرتين ما من هذه الطفرات حدث التكامل بينها والذى أدى الى حدوث تحلل للخلايا البكتيرية من السلالة k_{12} وتكون بقع صغيرة الحجم تشبه البقع التى يكونها الطراز البرى من هذا البكتريوفاج (T_4^+).

وبعد اخضاع هذه الطفرات التى تحدث فى البكتريوفاج T_4^+ وتسبب التحلل السريع لاختبار التكامل وباستخدام السلالة البكتيرية k_{12} كعائل لتكاثر هذه الطفرات استطاع بنزر Benzer أن يقسم هذه الطفرات الى قسمين رئيسيين هما (شكل ١٩) :

- ١- طفرات القسم A (rII A mutants) وهى الطفرات التى لا يحدث التكامل بين أى طفرتين منهما عند استخدامهما فى العدوى المختلطة للسلالة k_{12} من البكتيريا *E. coli* ولكن يحدث تكامل بين أى طفره من طفرات هذا القسم وأى طفرة أخرى من طفرات القسم B.
- ٢- طفرات القسم B (rII B mutants) وهى أيضاً الطفرات التى لا يحدث التكامل بين أى طفرتين منهما عند استخدامهما فى العدوى المختلطة للسلالة k_{12} من البكتيريا *E. coli* ولكن يحدث التكامل بين أى طفرة من طفرات هذا القسم وأى طفرة أخرى من طفرات القسم A.

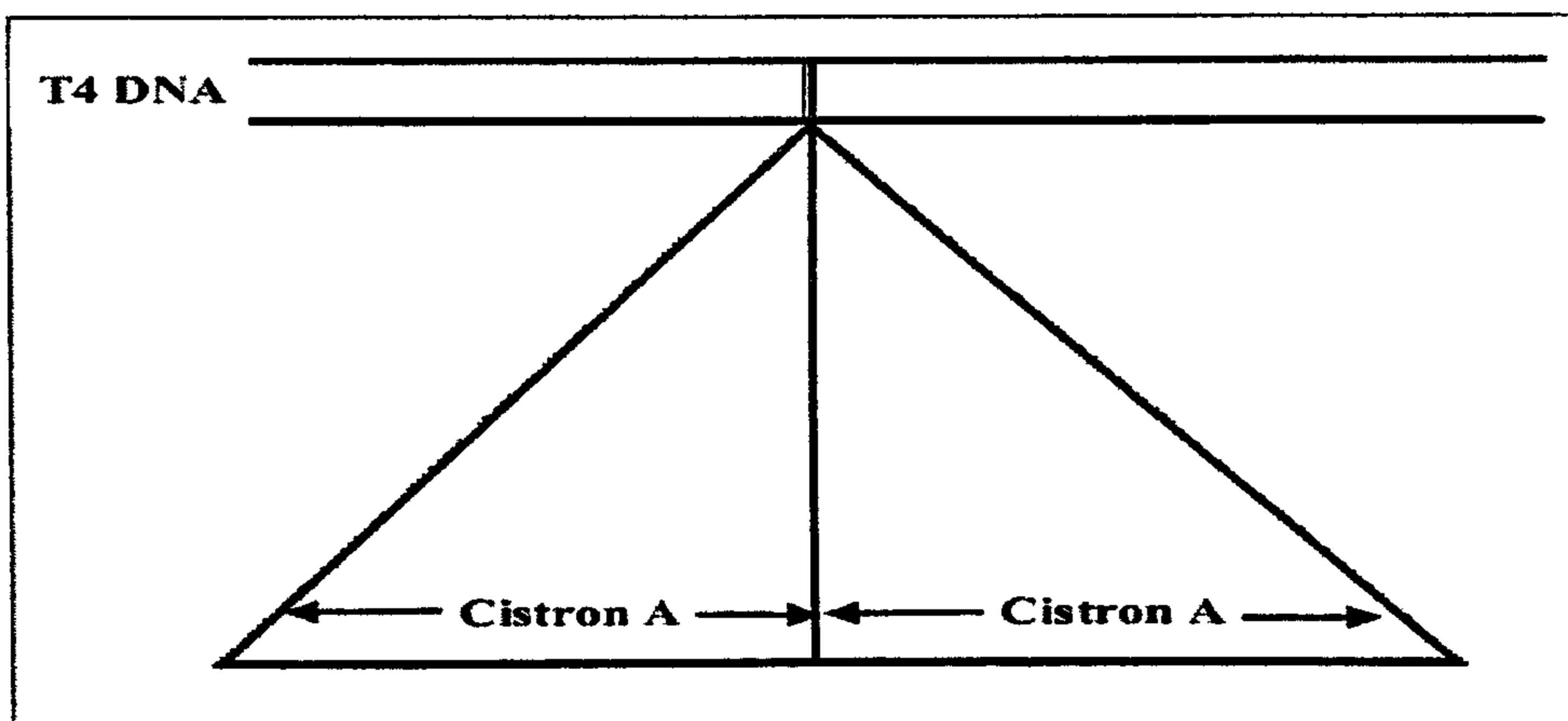


شكل (١٩): يوضح حدوث التكامل (Complementation) لطفرات التحلل السريع rII

شرح شكل (١٩)

- A-** العدوى المختلطة لطفرتين من طفرات القسم A ($rII A$) للسلالة البكتيرية k_{12} من البكتيريا *E. coli* ولا يحدث تكامل لغياب الوظيفة الطبيعية للجين (السسترون) A.
- B-** العدوى المختلطة لطفرتين من طفرات القسم B ($rII B$) للسلالة البكتيرية k_{12} من البكتيريا *E. coli* ولا يحدث تكامل لغياب الوظيفة الطبيعية للجين (السسترون) B.
- C-** العدوى المختلطة لطفرة من القسم A ($rII A_1$) وطفرة من القسم B ($rII B_1$) للسلالة البكتيرية k_{12} من البكتيريا *E. coli* وحدث التكامل بين الطفرتين حيث أن الطفرة $rII A_1$ طبيعية بالنسبة للسسترون B والطفرة $rII B_1$ طبيعية بالنسبة للسسترون A.

ولقد استنتج بنزر (Benzer) من هذه التجارب التى أجراها أن المنطقة الوراثية أو الموقع الوراثى (Genetic locus) فى البكتريوفاج T_4 (Bacteriophage) والمسؤلة عن حدوث تحلل (Lysis) الخلايا البكتيرية العائلة يمكن تقسيمها الى وحدتين وظيفيتين (Functional units) هما الوحدة الوظيفية A والوحدة الوظيفية B وعلى ذلك يمكن استنتاج أن الشكل المظهرى لصفة تحلل الخلايا البكتيرية العائلة بواسطة البكتريوفاج T_4 يتحكم فيها وحدتين وظيفيتين (شكل ٢٠).



شكل (٢٠): يوضح الموقع الجينى (Genetic locus) فى البكتريوفاج T_4 الذى يتحكم فى صفة التحلل المظهرية (Lysis phynotype) والذى يتركب من وحدتين وظيفيتين أو سسترونين هما :

- سسترون A (Cistron A) والذى لا يحدث تكامل بين الطفرات التى تحدث به .

- سسترون B (Cistron B) والذى لا يحدث تكامل بين الطفرات التى تحدث به أيضاً ولكن يحدث تكامل بين أى طفرة فى السسترون A وأى طفرة أخرى فى السسترون B .

ولقد ابتكر بنزر (Benzer) اصطلاح سسترون (Cistron) ليشير الى وحدة الوظيفة (Functional unit) بدلاً من استخدام اصطلاح جين (Gene) وخاصة فى الصفات أو الشكل المظهرى (Phenotype) المحدد الذى يتحكم فيه أكثر من وحدة وظيفية وأن هذه الوحدة الوظيفية السسترون (Cistron) لا يحدث تكامل بين الطفرات التى تحدث فيها ومع ذلك فإن اصطلاح سسترون (Cistron) يعادل اصطلاح الجين (Gene) والذى هو عبارة عن

تلك الكمية من الـ DNA التى تؤدى وظيفة واحدة. وفى هذه الأيام يستخدم اصطلاح جين (Gene) بصورة أكثر شيوعاً عن اصطلاح سسترون (Cistron) وإن كان كلاهما يشير الى نفس الكينونة (Entity) . ومن المفضل والمنطقى استخدام اصطلاح سسترون (Cistron) فى حالة الجينات التى تشترك فى إنتاج صفة مظهرية محددة أو فى حالة الجينات التى تشترك فى إنتاج بروتينات خلوية تتركب من أكثر من نوع من السلاسل عديدة الببتيد سواء كانت هذه البروتينات هى بروتينات تركيبية أو بروتينات وظيفية مثل الإنزيمات.

The Recon

الريكون

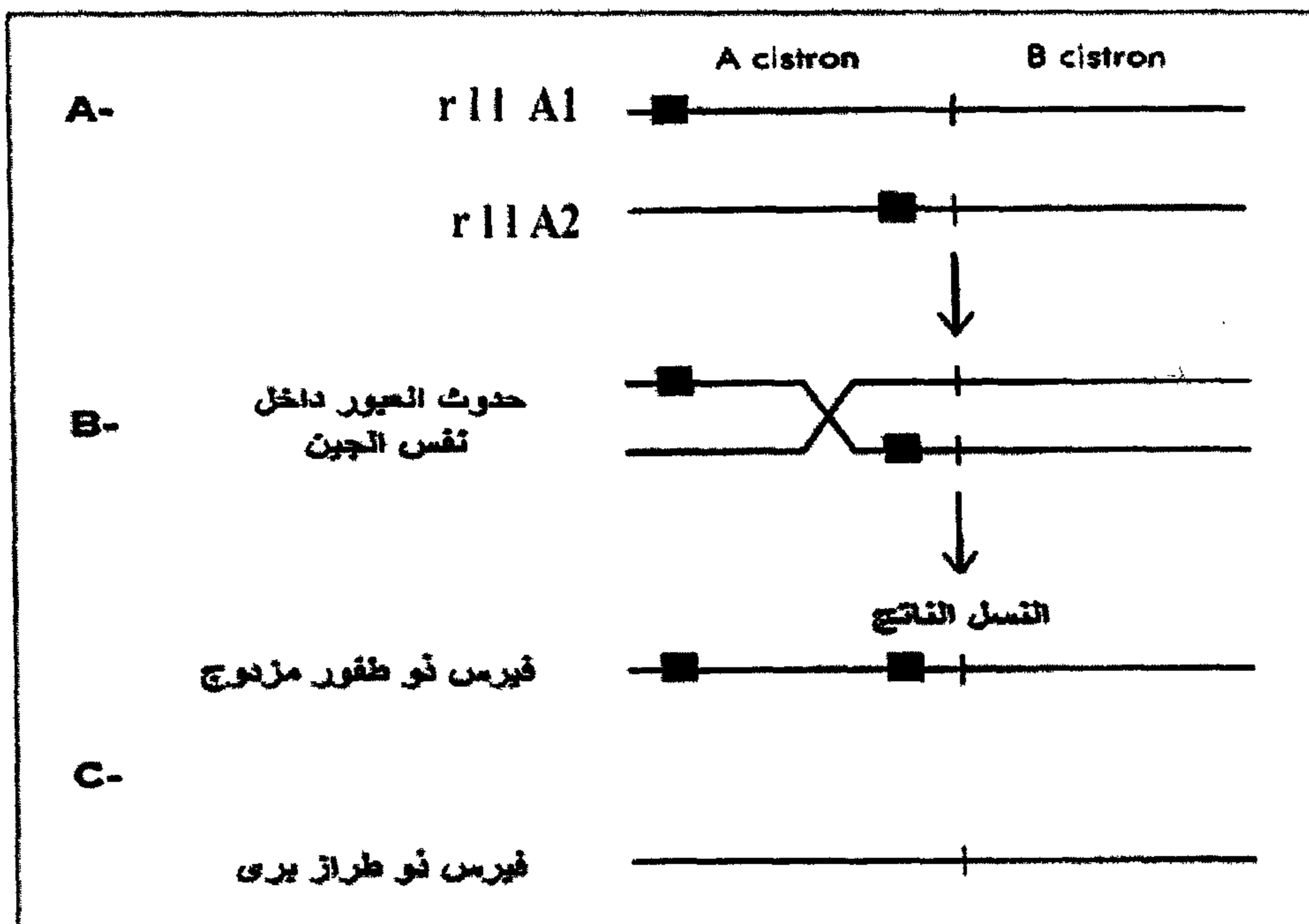
وجد بنزر Benzer أنه عند استخدام العدوى المختلطة لأى طفرتين من طفرات القسم A (rII A mutants) بأعداد كبيرة فى عدوى السلالة البكتيرية B من البكتيريا *E. coli* وكذلك أيضاً عند استخدام العدوى المختلطة لأى طفرتين من طفرات القسم B (rII B mutants) بأعداد كبيرة فى عدوى السلالة B من البكتيريا *E. coli* أنه بالإضافة الى تكوين البقع الكبيرة ذات الحواف المستوية وهى البقع التى يحدثها الطراز الطفرى من هذه الطفرات لاحظ أيضاً تكون بقع صغيرة ذات حواف متعرجة تشبه البقع (Plaques) التى يحدثها الطراز البرى من هذا البكتريوفاج (T_4^+). لاحظ بنزر (Benzer) أيضاً أن معدل تكون البقع الصغيرة ذات الطراز البرى معدل مرتفع لا يمكن أن يرجع الى حدوث أرتداد أى من الطفرتين الى الطراز البرى. والأكثر من ذلك أنه عندما قام بأخذ فيروسات من تلك الموجودة فى هذه البقع الصغيرة وأجرى بها عدوى السلالة B من البكتيريا *E. coli* وجد أن هذه الفيروسات تكون بقع صغيرة مطابقة تماماً لتلك البقع التى يكون الطراز البرى من البكتريوفاج T_4^+ وبذلك استنتج بنزر Benzer أن هذه الفيروسات ذات الطراز البرى ناتجة عن حدوث العبور (Crossing over) بين الطفرتين الموجودتين فى نفس الوحدة الوظيفية (السسترون) ولا يمكن أن تعزى الى حدوث الارتداد العكسى لأى من الطفرتين الى الطراز البرى حيث يؤدى حدوث العبور بين الطفرتين الى تكوين جزيئات فيروسيه ذات طراز برى (Wild type virus) (شكل ٢١). وتؤكد هذه النتائج على حدوث العبور داخل نفس الوحدة الوظيفية (نفس الجين أو نفس السسترون) والذي يعرف باسم العبور داخل نفس الجين (Intragenic crossing over) تمييزاً له عن العبور الذى يحدث بين الجينات (Intergenic crossing-over).

ولقد استطاع بنزر (Benzer) من استخدام طفرات نفس القسم سواء طفرات القسم A أو القسم B وإجراء العدوى المختلطة بأى طفرتين من أى منها للسلالة B من البكتيريا *E. coli* لتقدير المسافة الخريطية (Map distance) بين أى طفرتين من نفس القسم ووجد أن أصغر مسافة يمكن أن يحدث فيها العبور (Crossing over) تعادل أو تتأخر تلك المسافة تقريباً بين اثنين من أزواج القواعد داخل نفس الجين. وبذلك استنتج بنزر Benzer أن حدوث العبور (Crossing over) وتكوين تراكيب وراثية جديدة يمكن أن يحدث فى بعض الحالات بين أزواج القواعد فى نفس الجين أو نفس السسترون. ولذلك ابتكر بنزر (Benzer) استخدام اصطلاح ريكون (Recon) ليشير الى أصغر وحده من الجين يحدث بينها العبور وتكوين تراكيب وراثية جديدة وهذه المسافة تعادل المسافة بين زوجين من القواعد المتجاورة فى نفس الجين عند أدنى مستوى لها.

The Muton

الميتون

نظراً لأن أصغر مسافة داخل نفس الجين (نفس السسترون) يمكن يحدث فيها العبور تعادل المسافة بين زوجين من القواعد المتجاورة فى نفس الجين وذلك على طول الجين تتباً بنزر (Benzer) بأن أدنى مستوى من الجين (السسترون) يمكن أن تحدث به الطفرة يمثل حدوث الطفرة فى زوج من القواعد ومنذ ذلك الوقت أوضحت الأدلة التجريبية الإضافية حدوث الطفرة عند مستوى زوج من القواعد داخل نفس الجين (نفس السسترون) ومن بين هذه الأدلة تلك التى جاءت من تحليل هيموجلوبين الدم الطبيعى والهيموجلوبين الطافر حيث وجد أن الاختلاف بينهما يرجع الى إحلال الحامض الأمينى الفالين (Valine) فى الهيموجلوبين الطافر بالحامض الأمينى جلوتاميك (Glutamic) فى الهيموجلوبين الطبيعى وأن الشفرة الوراثية Genetic code للحامض الأمينى الجلوماتيك هي (GAG) بينما الشفرة الوراثية للحامض الأمينى الفالين هي (GTG) ويتضح من ذلك أن التغير فى الشفرة كان عند مستوى زوج من القواعد حيث حدث إحلال للقاعدة ثيمين (Thymine (T محل القاعدة أدينين (Adenine (A). وعلى ذلك ابتكر بنزر Benzer اصطلاح ميتون (Muton) ليشير الى أصغر وحدة طفور داخل نفس الجين أو نفس السسترون وهى تعادل زوج واحد من القواعد على طول الجين أو طول السسترون عند أدنى مستوى للطفور.



شكل (٢١): يوضح حدوث العبور داخل نفس السسترون أو داخل نفس الجين
(Intragenic crossing-over)

- A- حدوث العدوى لطفرتين من القسم *rIIA* للسلالة البكتيرية B من البكتيريا *E. coli* .
- B- حدوث العبور بين الطفرتين من القسم *rIIA* فى نفس السسترون (Cistron A) .
- C- ينتج عن هذا العبور طرازين من النسل الفيرسى أحدهما نو طفور مزدوج والذي لا يستطيع مهاجمة السلالة *k12* من البكتيريا *E. coli* والطراز الآخر فيرس طبيعى يمكنه أن يهاجم السلالة *k12* من البكتيريا *k12* وينتج بقع (Plaques) صغيرة.

التعريف الدقيق للجين Fine definition of a gene

من نتائج هذه الأبحاث والدراسات السابقة يمكن أن نضيف الى معلوماتنا تعريف أكثر دقة للجين وهو أن الجين عبارة عن منطقة كروموسومية محددة ومسئول عن وظيفة خلوية واحدة ويتركب الجين من تتابع طويل من النيوكليوتيدات يتضمن مواقع طفيرية (Mutable sites) والتي يمكن أن يحدث بينها العبور لتكوين تراكيب وراثية جديدة.

تركيب الجين فى الكائنات حقيقية النواة Structure of Eukaryotic Gene

يمكن إجراء اختبار التكامل بكل سهولة فى الكائنات الدقيقة وذلك لوجود أعداد كبيرة من النسل و الذي يمكننا من تحديد و تعيين الاختلافات الوراثية النادرة ولكن ليس من السهل إجراء هذا الاختبار فى الكائنات حقيقية النواة وذلك لصعوبة الحصول على نسل كبير وكذلك صعوبة فحص هذا النسل ومع ذلك يوجد مثالين فى الكائنات حقيقية النواة أمكن تطبيق هذا الاختبار عليهما.

١. الموقع الجيني الذي يتحكم فى لون العين الوردي (Rosy locus) فى حشرة الدروسوفيل. فعندما اجري اختبار التكامل على طفرات هذا الموقع الجيني أوضحت النتائج أن هذا الموقع الوراثي يتركب من وحدتين تكامليتين او وحدتين وظيفيتين وعلى ذلك فإن هذا الموقع الجيني الذي يتحكم فى صفة مظهرية واحدة وهي لون العين فى الدروسوفيل يتركب من سسترونين (Cistrons).

٢. الموقع الجيني الذي يتحكم فى شكل الاندوسبرم الشمعي (Waxy locus) فى حبوب الذرة وبإجراء اختبار التكامل بين طفرات هذا الموقع الوراثي وجد أنه يتركب من ستة وحدات تكاملية أو ستة وحدات وظيفية أو ستة سسترونات وعلى ذلك يتضح أن تعريف الجين على أساس اختبار التكامل قابل للتطبيق أيضاً فى الكائنات حقيقية النواة.

ومع ذلك فإن جينات الكائنات حقيقية النواة تتميز بمظهر تركيبى فريد والذي لا يتواجد فى الكائنات غير حقيقية النواة (Prokaryotes) حيث اكتشف فى نهاية السبعينات من القرن العشرين أن عدد من جينات الكائنات حقيقية النواة تحتوى على طرازين من التتابعات النيوكليوتيدية هما:

١- التتابع النيوكليوتيدى الشفرى أو الإكزون (Coding Sequence or Exon) وهو ذلك التتابع النيوكليوتيدى الموجود بالجين والذي ينسخ ويترجم فى النهاية الى أحماض أمينية فى البروتين الناتج من نسخ وترجمة الجين.

٢- التتابع النيوكليوتيدى غير الشفرى أو الإنترون (Non coding sequence or Intron) وهو ذلك التتابع النيوكليوتيدى الموجود بالجين والذي ينسخ ولا يترجم الى أحماض أمينية فى البروتين الناتج من نسخ وترجمة الجين.

ويحتوى الجين الواحد على عدد من الإكزونات وعدد من الإنترونات التى تتواجد فى صورة متبادلة مع الإكزونات على طول الجين. ووجود الإنترونات يكون محدداً بجينات الكائنات حقيقية النواة باستثناء عدد قليل من الجينات الفيروسية فى بعض الفيروسات مثل الادينوفيرس (Adenovirus) والذي يتكاثر فقط فى نواة خلايا الكائنات حقيقية النواة. وفى الكائنات حقيقية النواة فإن كل جيناتها تحتوى على الإنترونات بالإضافة الى الإكزونات باستثناء الجينات التى تنتج بروتين الهستون والجينات التى تنتج الإنترفيرونات (Interferons) وهى بروتينات مضادة للنشاط الفيروسى. ويتراوح عدد الإنترونات الموجودة بجينات الكائنات حقيقية النواة من عدد قليل الى عدد كبير من الإنترونات فى الجين الواحد ومن أمثلة ذلك ما يلى:

١. جين الألفاجلوبين (α globin gene) يحتوى على إنترونين وثلاثة إكزونات.
٢. جين أوفالبيومين (Ovalbumin gene) فى الدجاج يحتوى على سبعة إنترونات وثمانية إكزونات.
٣. جين ألفاكولاجين (Alpha-collagen gene) يحتوى على خمسون إنترون وإحدى وخمسون إكزون.

ويجب ملاحظة أن الجين يبدأ دائماً بإكزون وينتهى بإكزون آخر. ووجود الإنترونات فى جينات الكائنات حقيقية النواة يبدو أنه يمثل إنتهاك بين طول الجين أو طول المنسخ الأولى الناتج من نسخ هذا الجين (Hetrogenous nuclear RNA (hnRNA وطول السلسلة عديدة الببتيد (Polypeptide chain) الناتجة من نسخ وترجمة جين ما حيث يكون المنسخ الأولى (hnRNA) أكبر بكثير من طول السلسلة عديدة الببتيد الناتجة من نسخ وترجمة ذلك الجين وبالرغم من ذلك فسوف نظل ننظر للجين (Gene) أو السسترون (Cistron) على أنه ذلك التتابع النيوكليوتيدى من الـ DNA والمسئول عن تخليق نوع واحد من السلاسل عديدة الببتيد وأن هذا التتابع النيوكليوتيدى يحتوى على مواقع طفرية والتي يحدث بينها العبور داخل نفس الجين أو نفس السسترون لتكوين تراكيب وراثية جديدة وأن وجود الإنترونات فى جينات الكائنات حقيقية النواة لا يغير مفهومنا عن التركيب الدقيق للجين. ويرجع اكتشاف احتواء جينات الكائنات حقيقية النواة على كل من الإكزونات والإنترونات الى اكتشاف كل من:

١- المنسخ الأولى (Primary transcript) أو ما يعرف باسم الـ hnRNA هو ذلك المنسخ الأولى الناتج من نسخ الجين بما يحتويه من الإكزونات والإنترونات والذي يتحول داخل النواة (Nucleus) وقبل ذهابه الى السيتوبلازم الى جزيء mRNA الناضج والذي تتم ترجمته الى البروتين المناسب داخل السيتوبلازم.

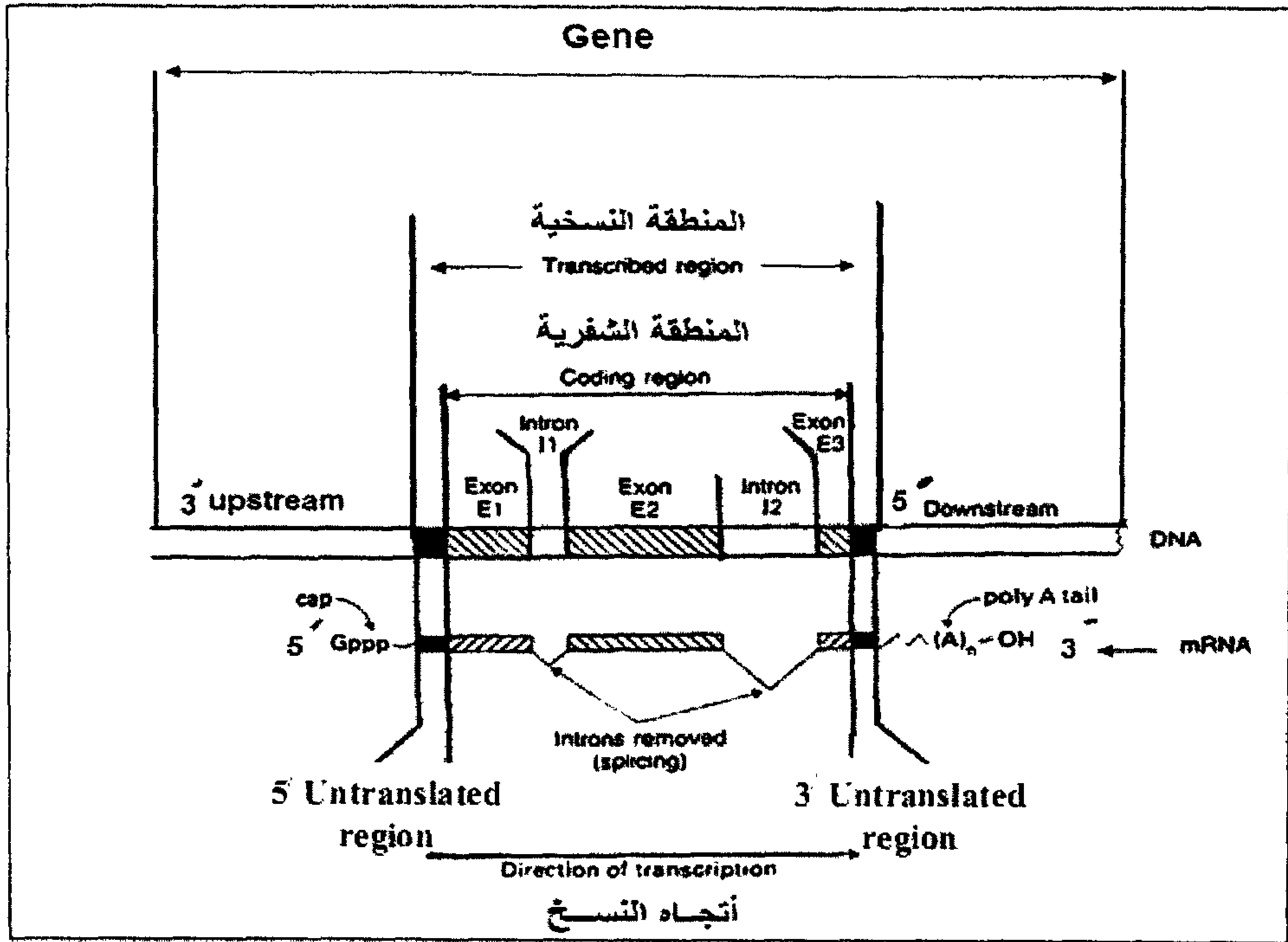
٢- عملية وصل الـ RNA (RNA splicing process) وتتلخص هذه العملية فى إزالة الإنترونات من الـ hnRNA وتجميع الإكزونات وتكوين جزيء الـ mRNA الناضج والفعال وظيفياً داخل النواة وذلك بمساعدة الإنزيمات الخلوية اللازمة لذلك حيث تتم هذه العملية بكل دقة ويترتب على ذلك تكوين جزيئى الـ mRNA الناضج الذى يترك النواة ويذهب الى السيتوبلازم لترجمته الى البروتين المناسب.

التصميم العام للجينات التي تحمل شفرات البروتين في الكائنات حقيقية النواةGeneral plan of a protein coding gene in eukaryotes

تتركب الجينات التي تنسخ (Transcription) وتترجم (Translation) الى الأنواع المختلفة من البروتينات الخلوية في الكائنات حقيقية النواة (Eukaryotes) والتي يقوم بنسخها إنزيم البلمرة RNA polymerase II من ثلاثة مكونات رئيسية (شكل ٢٢) وهى:

١- منطقة البروموتور (Promoter region) أو منطقة شمال بداية الجين (3' Upstream region) وتتحكم هذه المنطقة في ابتداء نسخ الجين وذلك عن طريق ارتباط إنزيم بلمرة RNA بها ليبدأ نسخ الجين وتضم هذه المنطقة عدد من العناصر التي تتحكم في نسخ الجين منها العناصر اللازمة لحدوث أعلى معدل من نسخ الجين مثل المعززات (Enhancers) والعناصر اللازمة لتنظيم التعبير الجيني للجين وذلك إما بالاستجابة لمنبه بيئي أو الاستجابة لبرنامج النمو. وكل هذه العناصر تمثل تتابعات من النيوكليوتيدات والتي يكون بعضها ذو تتابع فريد (Unique) بالنسبة لبعض الجينات. وبصفة عامة تعرف التتابعات النيوكليوتيدية الموجودة في هذه المنطقة بالصندوق (TATA box) أو الصندوق (CCAAT box) حيث وجدت هذه التتابعات في عدد من جينات الكائنات حقيقية النواة التي تنتج البروتينات الخلوية.

٢- منطقة انتهاء النسخ (Termination region) أو المنطقة يمين انتهاء نسخ الجين (5' Downstream region) وتقع هذه المنطقة في الطرف 5' من الجين (شكل ٢٢) وتحتوى على العناصر اللازمة لإنهاء نسخ الجين والتي غالباً ما تتركب من تتابعات نيوكليوتيدية فريدة حيث يتوقف إنزيم البلمرة RNA polymerase II من الاستمرار في النسخ عندما يصل الى هذه المنطقة من الجين، كما تحتوى على المعلومات اللازمة لتكوين الذيل (Tail) والذي يتركب من عدد من نيوكليوتيدات الأدينين (Poly A Tail) والذي يضاف على المنسخ الأولى (hnRNA) بعد نسخه ويتراوح طول هذه الذيل ما بين ٥٠ الى ٢٠٠ نيوكليوتيدة.



شكل (٢٢): يوضح التصميم العام لجين ما يحمل شفرات البروتين فى الكائنات حقيقية النواة
General plan of a protein coding gene in Eukaryotes

٣- المنطقة النسخية (Transcribed region): يبدأ نسخ الجين بواسطة إنزيم البلمرة

RNA polymerase II من عند شفرة البداية (Initiation codon) والتي توجد فى بداية هذه المنطقة النسخية ويستمر الإنزيم فى نسخ الجين وتكوين المنسخ الأولي (hnRNA) ويتوقف عن الاستمرار فى نسخ الجين عندما يصل الإنزيم الى ذلك التابع النيوكليوتيدى الذى يحدد انتهاء نسخ الجين وتتركب هذه المنطقة من ثلاثة مكونات (شكل ٢٢) هي:

أ- المنطقة التى لا تترجم فى الطرف 3' وتسمى باسم 5' Untranslated region (5'UTR) وهى المنطقة من الجين التى تنسخ ولا تترجم وتقع فى الطرف 5' من المنطقة النسخية وتحتوى على تتابع نيوكليوتيدى يختلف طوله باختلاف الجينات حيث تتراوح طولها ما بين ٣٥ نيوكليوتيدة الى ٦٧٠ نيوكليوتيدة وتلعب دوراً فى تنظيم التعبير الجينى ما بعد النسخ.

ب- المنطقة التى لا تترجم فى الطرف 3' وتسمى باسم (3'UTR) Untranslated region 3' وتقع فى الطرف 3' من المنطقة النسخية وملاصقة لآخر إكزون (Exon) فى الجين ويتراوح طولها ما بين ٥٠ الى ٢٠٠ نيوكليوتيدة فى بعض الجينات وتؤثر هذه المنطقة فى عملية الترجمة وثبات جزيء الـ mRNA الناضج.

ج- المنطقة الشفرية (Coding region) وتقع بين المنطقتين السابقتين وتحتوى على طرازين من التتابعات النيوكليوتيدية هما التتابعات النيوكليوتيدية الشفرية (Coding sequences) أو الإكزونات (Exons) وهى تلك التتابعات النيوكليوتيدية التى تنسخ وتترجم الى الأحماض الأمينية فى البروتين الناتج من نسخ الجين وترجمته والتتابعات النيوكليوتيدية غير الشفرية (Noncoding sequences) أو الإنترونات (Introns) وهى تلك التتابعات النيوكليوتيدية من الجين التى تنسخ ولا تترجم الى أحماض أمينية فى البروتين الناتج من نسخ وترجمة الجين. ويتواجد كل من الإكزونات والإنترونات فى صورة متبادلة داخل المنطقة النسخية ولا بد أن تبدأ المنطقة النسخية من الجين بإكزون وتنتهى بإكزون آخر. ويقوم إنزيم البلمرة الـ RNA polymerase II بنسخ كل من الإكزونات والإنترونات الموجودة فى المنطقة النسخية من الجين وبالتالي يتكون المنسخ الأولى (hnRNA) والذى يمثل الغالبية العظمى من الـ RNA الموجود بالنواة الذى تحدث منه إزالة للإنترونات وتجميع الإكزونات معاً بواسطة عمليات إنزيمية معقدة تتم بكل دقة لتكوين جزيء الـ mRNA الناضج الذى يترك النواة ويذهب الى السيتوبلازم من خلال الثقوب الموجودة فى الغلاف النووى لترجمته فى السيتوبلازم الى البروتين المناسب.

Types of Genes

طرز الجينات

- تنقسم الجينات التى يتم نسخها بواسطة إنزيمات بلمرة الـ RNA (RNA polymerases) فى كل من الكائنات غير حقيقية النواة والكائنات حقيقية النواة الى قسمين رئيسيين هما:
- ١- الجينات التى تنسخ وتترجم الى الأنواع المختلفة من البروتينات الخلوية.
 - ٢- الجينات التى تنسخ فقط ولا تترجم الى بروتينات خلوية وهى تلك الجينات التى تنسخ الى أنواع أخرى من الـ RNA الخلوية مثل الـ tRNA والـ rRNA والأنواع الصغيرة من

الـ RNA السيتوبلازمى (scRNA) وكذلك الأنواع الصغيرة من الـ RNA النووى (snRNA) وسوف نتعرض فيما بعد بالتفصيل للطبيعة الكيميائية لنسخ الجينات.

أولاً: نسخ طرز الجينات المختلفة فى الكائنات غير حقيقية النواة

Transcription of different types of Prokaryotic genes

فى الكائنات غير حقيقية النواة مثل البكتيريا يقوم إنزيم البلمرة البكتيرى بنسخ كلا طرازين الجينات السابقة ونظراً لأهمية هذا الإنزيم فى نسخ كل الجينات البكتيرية فسوف نتناول تركيب هذا الإنزيم بالتفصيل حيث يتركب إنزيم بلمرة الـ RNA البكتيرى (RNA polymerase) من خمسة وحدات بروتينية هى:

١- سلسلتين عديدة الببتيد ألفا (α) وزن كل منها الجزيئى ٤٠٠٠٠ دالتون.

٢- سلسلة عديدة الببتيد بيتا (β) وزنها الجزيئى ١٥٠٠٠٠ دالتون.

٣- سلسلة عديدة الببتيد بيتا داش (β') وزنها الجزيئى ١٦٥٠٠٠ دالتون.

٤- سلسلة عديدة الببتيد سجما (δ) وزنها الجزيئى ٩٥٠٠٠ دالتون.

وعلى ذلك يصبح الوزن الجزيئى الكلى للإنزيم الكامل ($\alpha^2\beta'\beta\delta$) Holoenzyme هو ٤٩٠٠٠٠ دالتون ويعرف الجزء من الإنزيم الذى يتركب من $\alpha^2\beta'\beta$ باسم الإنزيم المركزى (Core enzyme). وتقوم السلسلة عديدة الببتيد سجما (δ) من الإنزيم فى التعرف على البداية الصحيحة لنسخ الجين وهى منطقة البروموتور (Promoter) من الجين ثم تنفصل عن الإنزيم الكامل فور التعرف على منطقة البروموتور وبداية نسخ الجين بينما يستمر الإنزيم المركزى (Core enzyme) ويستمر فى نسخ الجين من خلال ثلاثة مراحل أساسية سوف نتناولها بالتفصيل فى الباب الثالث ونظراً لوجود نوع واحد من إنزيمات بلمرة الـ RNA فى البكتيريا فإن الوحدة البروتينية سجما (δ) من هذا الإنزيم يمكنها أن تتغير فى التركيب لتواجه متطلبات نسخ طرز الجينات المختلفة بينما يظل باقى مكونات الإنزيم ثابتة التركيب.

ثانياً: : نسخ طرز الجينات المختلفة فى الكائنات حقيقية النواة

Transcription Of Different Types Of Eukaryotic Genes

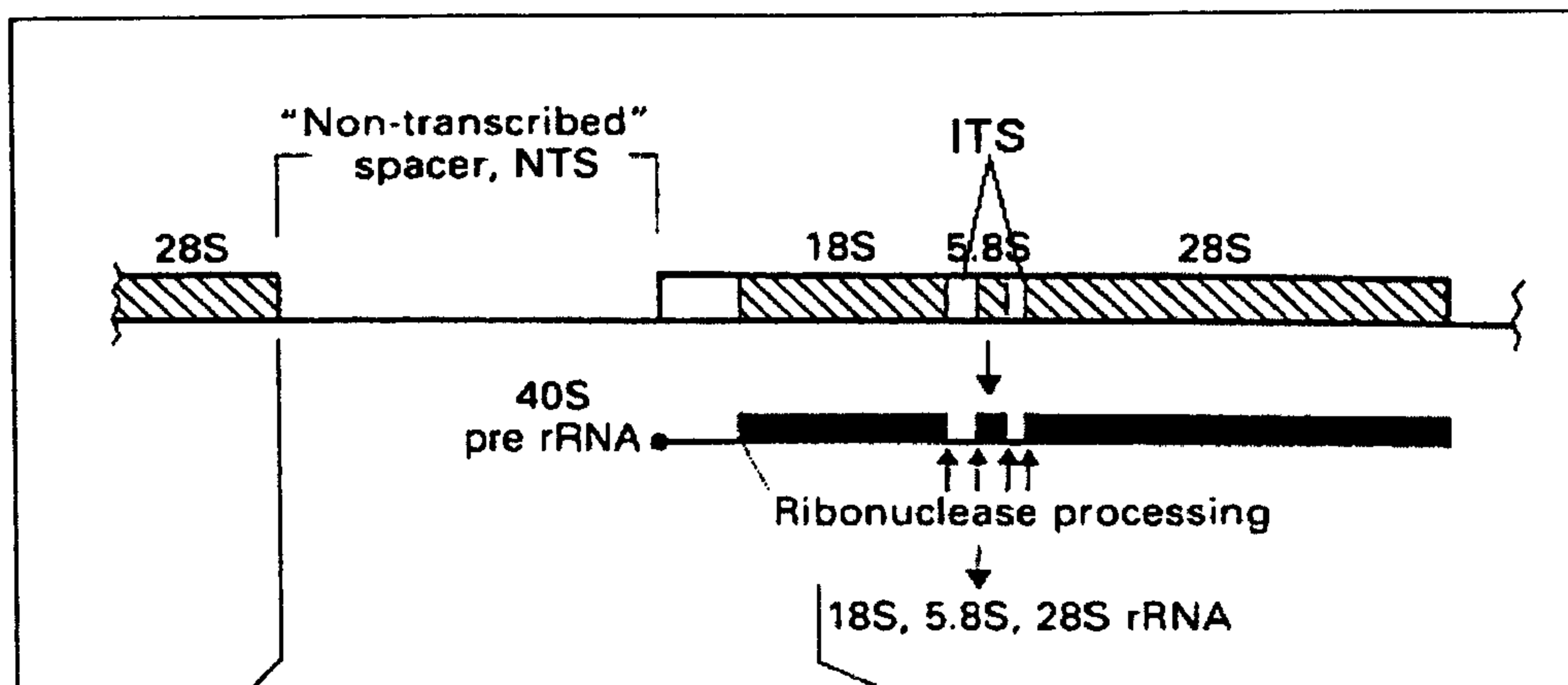
فى الكائنات حقيقية النواة يتم نسخ طرز الجينات المختلفة بواسطة ثلاثة أنواع مختلفة من

إنزيمات بلمرة الـ RNA وهى:

أولاً: إنزيم البلمرة RNA Polymerase I (Pol I)

ويقوم هذا الإنزيم بنسخ الجينات التى تنتج الأنواع المختلفة من الأحماض النووية الريبوسومية Ribosomal RNA (rRNA) المختلفة وهى 5.8SrRNA , 18SrRNA , 28SrRNA حيث يتم نسخ هذه الأنواع الثلاثة من الـ RNA المختلفة من على الجينات فى صورة منسخ أولى Pre-rRNA (شكل ٢٣) وتسمى الوحدة النسخية من الـ DNA التى تنسخ الى الأنواع الثلاثة السابقة من الـ rRNA بالوحدة النسخية (Transcriptional unit) وتضم هذه الوحدة النسخية مسافة من الـ DNA تفصل بين كل من 5.8S , 18S , 28S وتعرف هذه المناطق من الـ DNA باسم الـ DNA الداخلى الذى ينسخ (ITS) Internal transcribed spacer وتتفصل كل وحدة نسخية عن الأخرى بوجود مسافة من الـ DNA لا تنسخ (NTS) Non transcribed spacer وتتم إزالة الـ ITS من المنسخ الأولى pre-rRNA بواسطة ازيما (Endonucleases) لتكوين الأنواع الثلاثة من الأحماض النووية الريبوسومية المختلفة وهى 5.8SrRNA , 18SrRNA , 28SrRNA. وتكرر الجينات التى تنسخ الى الأنواع المختلفة من الـ rRNA فى معظم الكائنات حقيقية النواة بصورة متتالية (Tandem repeats) فى موقع أو أكثر من الجينوم.

ويحدث التعبير الجينى لهذه الجينات أو تنسخ هذه الجينات المتكررة بطريقة مثيرة أثناء عملية تكوين البويضات (Oogenesis) وكذلك فى مرحلة النمو الجنينى (Embryogenesis) لتقابل متطلبات تكوين الريبوسومات (Ribosomes) فى خلايا معينة والأكثر من ذلك أنه يحدث فى الضفدع الأفريقى *Xenopus laevis* تضخيم (Amplification) لهذه الجينات (rDNA) الى آلاف المرات فى خلية البويضة الأولية (Oocyte) لإنتاج قطع من الـ DNA غير الكروموسومية تحمل هذه الجينات (rDNA) الإضافية والتى يتم نسخها بصورة فعالة أثناء تكوين البويضات ثم يحدث لها إزالة بعد ذلك أو فقد أثناء الانقسام الميوزى.



شكل (٢٣): تنظيم الجينات التى تنسخ الى الأنواع المختلفة من الأحماض النووية الريبوسومية

Xenopus laevis فى الضفدع الافريقى rRNA genes

ثانياً: إنزيم البلمرة (pol II) RNA Polymerase II

ويقوم هذا الإنزيم بنسخ طرازين من الجينات هما:

١- الجينات التى تنسخ وتترجم الى الأنواع المختلفة من البروتينات الخلوية حيث يقوم هذا الإنزيم بنسخ هذه الجينات وتكوين جزيء الـ hnRNA والذي يتحول الى mRNA ليترجم الى البروتين المناسب كما سبق شرحه.

٢- الجينات التى تنسخ الى أنواع أخرى من الـ RNA الصغيرة النووية Small nuclear RNA (snRNA). وتوجد هذه الجينات فى صورة عائلات جينية متعددة (Multigene families) تحتوى ما بين عشرة الى مائة نسخة (Copies) من كل جين. وهذه الجينات تنسخ بواسطة هذا الإنزيم (pol II) الى أنواع من الـ RNA الصغيرة النووية (snRNA) تحتوى ما بين ٩٠ الى ٤٠٠ نيوكليوتيدة وتتميز بدرجة عالية من الثبات كما أنها ترتبط ببعض البروتينات ووظيفة هذه الأنواع من الـ snRNA أنها تشترك فى عملية تكوين جزيء الـ mRNA الناضج بإزالة الإنترونات من المنسخ الأولى (hnRNA) كما أنها لها دور فى عملية تكوين الذيل (Poly A tail) لجزيئات الـ mRNA.

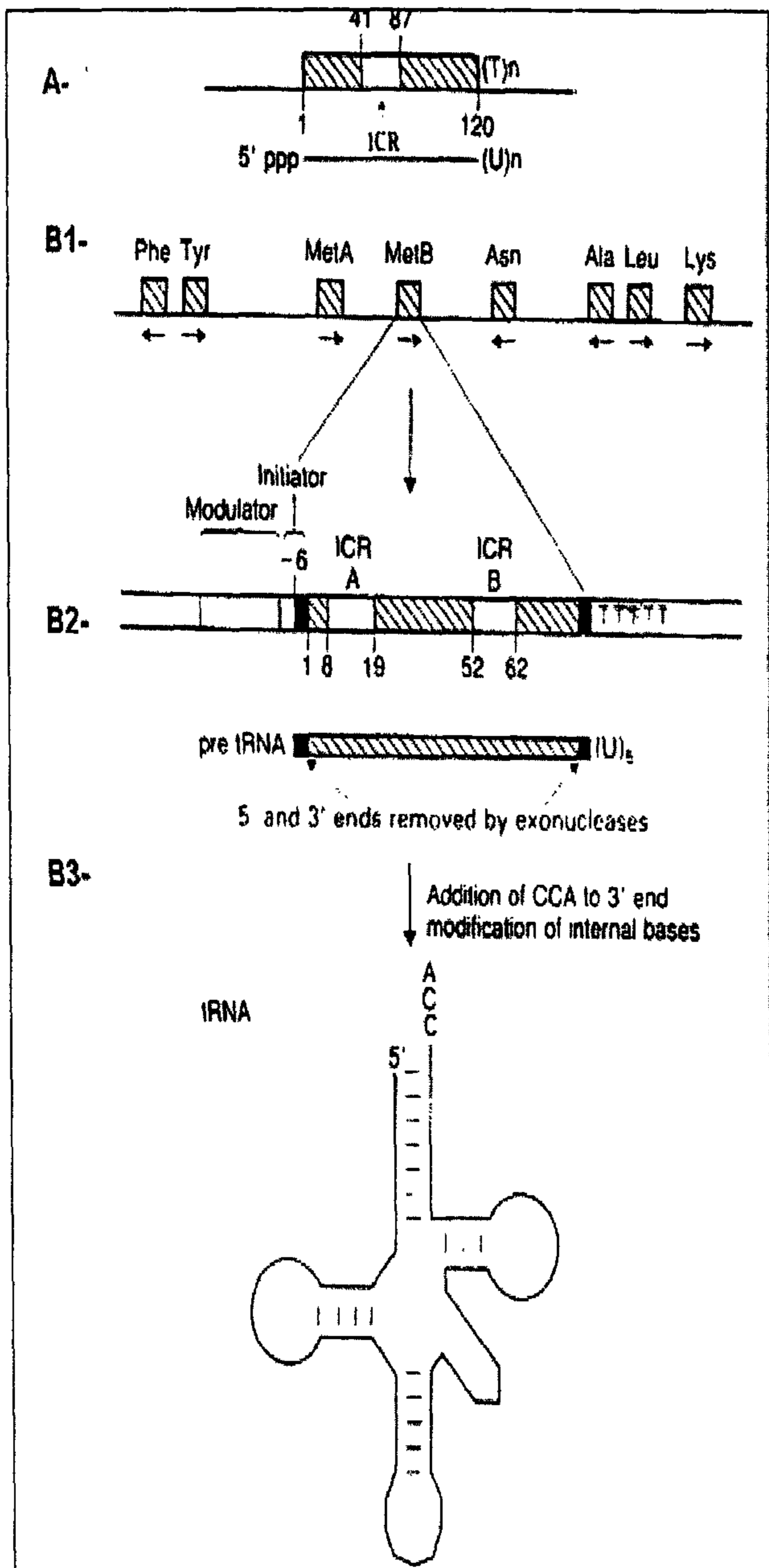
ثالثاً: إنزيم البلمرة (pol III) RNA Polymerase III

ويقوم هذا الإنزيم (pol III) بنسخ عدد من طراز الجينات المختلفة الصغيرة وهى:

١- جينات الـ 5SRNA genes : درست هذه الجينات دراسة مستفيضة فى الضفدع الأفريقى *Xenopus laevis* ووجد أن الجين الواحد منها (5S gene) يتكرر حتى يصل الى حوالى ٢٠٠٠٠ نسخة من الجين موزعة فى ثلاثة عائلات جينية متعددة. العائلة الأولى منها تضم ٤٠٠ نسخة من الجين 5SRNA gene ويظهر التعبير الجينى لجينات هذه العائلة فى خلية البيضة الأولية (Oocyte) وفى الخلايا الجسمية فى كل الأوقات ويسمى هذا الطراز من الجينات باسم Somatic type 5SRNA genes. والعائلة الثانية والثالثة تضم باقى جينات الـ 5SRNA gene والتي يظهر التعبير الجينى لها أثناء تكوين خلايا البويضات الأولية (Oocytes) بينما تكون ساكنة فى الخلايا الجسمية ويسمى هذا الطراز من الجينات باسم Oocyte-type 5SRNA genes ويتراوح طول كل جين من جينات الـ 5SRNA gene حوالى ١٢٠ نيوكليوتيدة.

ويحدث تنظيم التعبير الجينى لكل جين من هذه الجينات عن طريق بروجينوتور (Promoter) داخل المنطقة النسخية (ICR) Internal control region عن طريق تفاعل هذا البروجينوتور مع عديد من طرز البروتينات الخلوية (شكل ٢٤).

٢- جينات الـ tRNA genes : هذا الطراز من الجينات هى التى تنسخ الى الأنواع المختلفة من الأحماض النووية الناقلة (tRNA) والتى يبلغ طولها ٨٠ نيوكليوتيدة. وتوجد هذه الجينات فى الضفدع الأفريقى *Xenopus laevis* فى صورة متجمعة فى منطقة تحتوى على ٣١٠٠ نيوكليوتيدة فى الطول ويحدث نسخ لعديد من هذه الجينات فى صورة Polycistronic tRNA والذى يتجزأ بعد ذلك الى أنواع مختلفة من الـ tRNA. وتحتوى جينات الـ tRNA genes أيضاً على مناطق تحكم داخلى (ICR) Intragenic control regions ولكنها مجزئة فى منطقتين A , B وتؤثر المسافة بينهما على كفاءة عملية النسخ وللمنطقة A دور فى تحديد بداية نسخ الـ RNA ويرتبط بكلا المنطقتين A , B عوامل نسخ معينة. والتتابع النيوكليوتيدى الذى يسبق بداية الجين الذى ينسخ يقوم بتعزيز أو انخفاض معدل نسخ الجين ويسمى هذا التتابع النيوكليوتيدى باسم Modulator sequence (شكل ٢٤).



شكل (٢٤) يوضح ما يلي:

A- الجين 5SRNA gene واحتوائه على منطقة التحكم الداخلي (ICR).

B1- بعض جينات الأحماض النووية الناقلة المتجمعة في جزء من الجينوم (DNA) والتي تنسخ إلى الأحماض النووية الناقلة للأحماض الأمينية الفينيل ألانين (Phe) والتيروسين (Tyr) والميثونين (Met A) و (MetB) والألانين (Ala) والليوسين (Leu) والليسين (Lys).

B2- تركيب جين الحامض النووي الناقل للميثونين met B والذي يضم منطقة التحكم الداخلي (ICR) وهي منطقة A و B ومنطقة الـ Modulator ونسخه وتكوين المنسخ الأولي.

Pre-tRNA.

B3- إزالة الأطراف 3' و 5' من المنسخ الأولي pre-tRNA بواسطة إنزيمات الـ Exonucleases وإضافة CCA إلى الطرف 3' وتكوين الحامض النووي الناقل tRNA الذي يشبه ورقة البرسيم (Clover leaf).

٣- جينات الـ (scRNA) : Small Cytoplasmic RNA Genes

يوجد عديد من أقسام هذا النوع من الجينات (scRNA genes) لبعضها وظيفة أساسية بالخلية ومن بين هذه الأقسام الجينات المسماة 7SLRNA genes والتي تنتج الغالبية العظمى من الـ RNA السيتوبلازمي والتي تدخل في بناء مركب الريبونيوكليوبروتين (Ribonucleoprotein) والذي يعتبر مركب حاسم في عملية إفراز البروتين. وفي الكائنات حقيقية النواة مثل الثدييات والدروسوفيل والصفدع تحتوي الخلايا على أربعة جينات من هذا الطراز (7SLRNA genes) والفعالة وظيفياً وأن التابع النيوكليوتيدى لهذه الجينات الأربعة ثابت في الكائنات حقيقية النواة المختلفة.

التركيب العام لإنزيمات بلمرة الـ RNA في الكائنات حقيقية النواة

General Structure Of Eukaryotic RNA Polymerases

أوضح العالمين William Ruller , Robert Roeder عام ١٩٦٩ وجود ثلاثة أنواع من إنزيمات بلمرة الـ RNA في الكائنات حقيقية النواة سابقة الذكر. وتتشابه هذه الإنزيمات الثلاثة في التركيب إلى درجة كبيرة حيث يتركب كل إنزيم منها من عشرة وحدات بروتينية معقدة كما تتشابه هذه الإنزيمات الثلاثة في احتوائها على الوحدات البروتينية β و β' والتي تشابهان الوحدات البروتينية β و β' الموجودة في إنزيم البلمرة البكتيري، بينما باقى الوحدات البروتينية هي وحدات صغيرة في التركيب بعضها متشابه في التركيب في الإنزيمات الثلاثة وبعضها متشابه في التركيب في كل من إنزيم الـ pol I وإنزيم الـ pol III فقط ويقوم كل إنزيم من هذه الإنزيمات بنسخ طرز معين من الجينات كما سبق ذكره.

العائلات الجينية Gene Families

معظم الجينات التي تحمل شفرات البروتينات الخلوية المختلفة تكون ممثلة في الجينوم الأحادي (Haploid genome) بنسخة واحدة (One copy) وغالباً ما يشار إلى مثل هذه الجينات بالتتابعات النيوكليوتيدية الفريدة (Unique sequence) أو التتابعات النيوكليوتيدية المفردة (Single sequence). ومع ذلك فإن بعض الجينات تتواجد في صورة عائلة جينية (Gene family) والتي يمكن تعريفها بأنها مجموعة من الجينات المتشابهة في التركيب والوظيفة ويختلف عدد جينات العائلة الواحدة باختلاف العائلات الجينية وفيما يلي بعض خصائص العائلات الجينية:

١- بعض العائلات الجينية تكون جيناتها متجمعة في نفس الموقع من الكروموسوم حيث تتكرر جينات العائلة في صورة مكررات متتالية حيث يفصل كل جين عن الآخر بمسافة صغيرة من الـ DNA ومن أمثلة هذا النوع من العائلات الجينية المتكررة :

أ- عائلة جينات الأحماض النووية الريبوسومية (rRNA genes) وهي الجينات التي تنسخ إلى الأنواع المختلفة من الأحماض النووية الريبوسومية rRNA، حيث تتكرر هذه الجينات آلاف المرات في ترتيب طولي على الكروموسوم السادس في نبات الذرة، بينما في الإنسان يتراوح عدد جينات هذه العائلة ما بين ٥٠ إلى ٢٠٠ جين موزعة على خمسة كروموسومات مختلفة.

ب- عائلة جينات هستون حيث تتكون العائلة الجينية من خمسة جينات متتالية بالترتيب H1-H4- H2B- H3- H2A في قنفذ البحر *Lyctinus pictus* وتتكرر العائلة الواحدة التي تضم الجينات الخمسة بالترتيب السابق عديد من مئات المرات في صورة مكررات متتالية. ومع ذلك، يوجد ما بين ٥ إلى ٢٠ جين إضافي لكل جين من الجينات الخمسة السابقة موزعة بصورة مفردة في مناطق أخرى من الجينوم في صورة أورفون (Orphon) وعلى ذلك يمكن تعريف الأورفون بأنه أحد جينات العائلة الجينية الموجود بصورة مفردة والذي يمكن عزله وفصله في صورة نقية.

ولقد وجد فى قنفذ البحر أن التعبير الجيني لجينات العائلة المتكررة يظهر فى مراحل النمو الأولى بينما يظهر التعبير الجيني للجينات المفردة أو الأورفون لنفس العائلة الجينية فى مراحل النمو المتأخرة.

٢- بعض العائلات الجينية الأخرى والتي يبدو أنها نشأت عن طريق التكرار المتتالي وينفصل كل جين من جينات العائلة عن الجينات الأخرى بوجود مناطق طويلة من الـDNA ومن أمثلة ذلك العائلة الجينية للموقع Histocompatibility locus (H-2 locus) فى الفأر (Mice) حيث تضم هذه العائلة ٣٦ جين موزعة فى ١٣ موقع ويضم أكبر موقع منها سبعة جينات بطول ١٩١٠٠٠ نيوكليوتيدة وينفصل كل جين من هذه الجينات السبعة عن الجينات الأخرى بوجود مسافة من الـDNA تحتوى ما بين ٧٠٠٠ إلى ٢٨٠٠٠ نيوكليوتيدة.

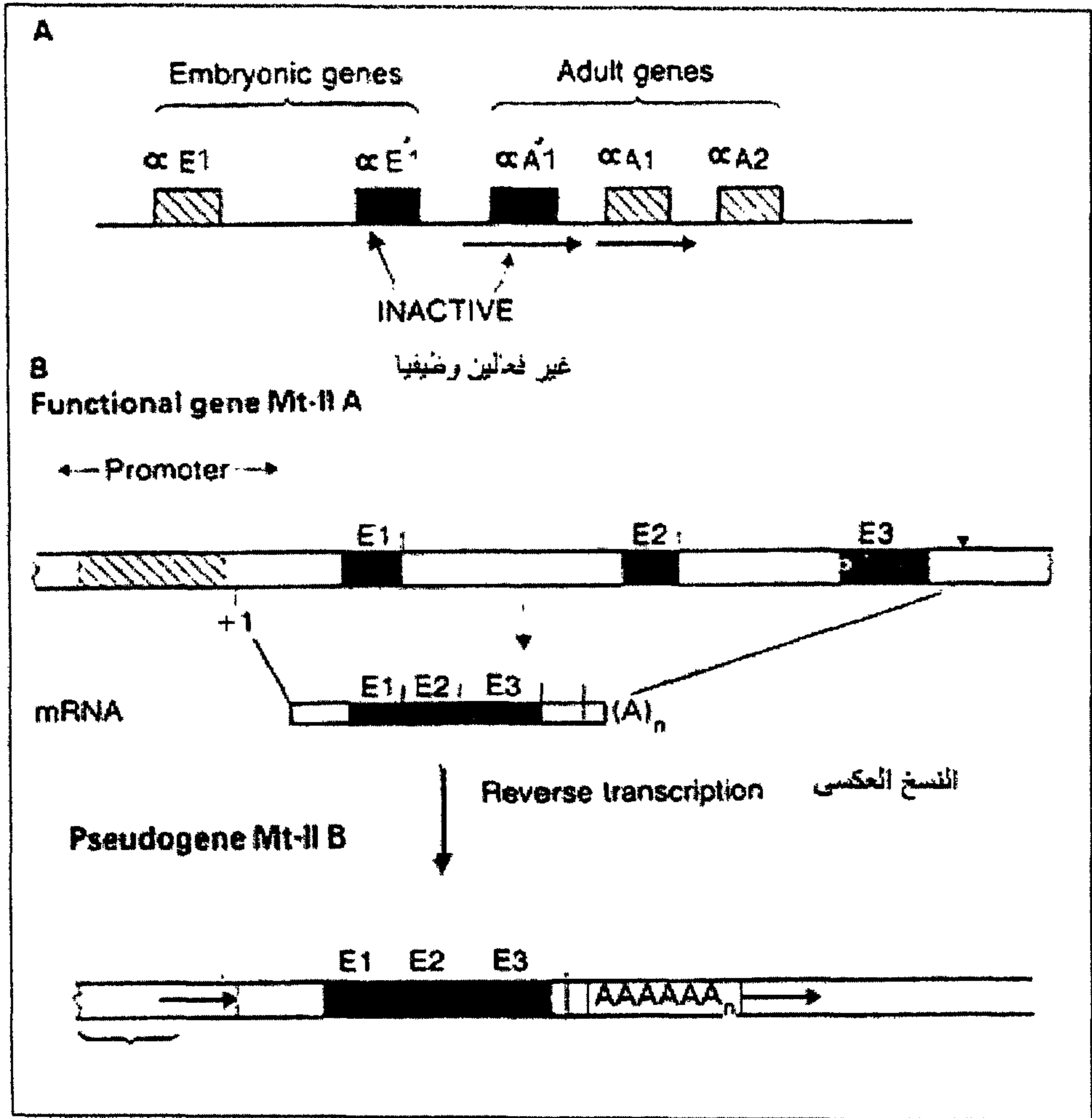
٣- بعض العائلات الجينية التى تحتوى على جينات تنتج نفس البروتين ولكن يظهر التعبير الجيني لجينات هذه العائلة فى مراحل مختلفة من النمو. فعلى سبيل المثال فإن عائلات جينات ألفاجلوبين (α globin) فى الإنسان تضم خمسة جينات تقع على الكروموسوم رقم ١٦، حيث يظهر التعبير الجيني لأحد هذه الجينات وهو الجين $\alpha E1$ فى مرحلة النمو الجيني بينما يظهر التعبير الجيني لكل من الجين $\alpha A1$ والجين $\alpha A2$ فى الأفراد البالغة Adults (شكل ٢٥).

وفى الكائنات حقيقية النواة التى تحتوى على جينات تشترك فى إنتاج بروتين وظيفي يتركب من أنواع عديدة من السلاسل عديدة الببتيد (Polypeptide chain) المختلفة لا تكون متجمعة فى موقع محدد من الجينوم (Genome)، فعلى سبيل المثال، يقع جين ألفاجلوبين (α -globin) على الكروموسوم رقم ١٦ فى الإنسان بينما يقع جين البيتا جلوبين (β -globin) على الكروموسوم رقم ١١ فى الإنسان. وفى الكائنات غير حقيقية النواة تكون الجينات التى تشترك فى إنتاج بروتين وظيفي متجمعة معاً فى مكان محدد من الجينوم البكتيري.

وفى الكائنات حقيقية النواة التى تحتوى على جينات تشترك فى إنتاج مجموعة من الإنزيمات المختلفة التى تشترك فى نفس الممر التخليقي الحيوي أو نفس الممر الهدمي الحيوي لا تكون متجمعة (Cluster) فى مكان محدد من الجينوم بينما فى الكائنات غير حقيقية النواة تكون هذه الجينات متجمعة فى مكان محدد من الجينوم. فعلى سبيل المثال، تكون الجينات الثلاثة التى تنتج الإنزيمات الثلاثة اللازمة لميتابوليزم سكر الجلاكتوز (Galactose) وهى:

- 1- Galactose- 4- epimerase
- 2- Galactose- 1- phosphate uridyl transferase
- 3- Galactokinase

موزعة على الكروموسومات ١٧، ٩، ١ على الترتيب فى الإنسان، بينما فى البكتيريا تكون هذه الجينات الثلاثة متجمعة فى مكان محدد من الجينوم البكتيري. ومن الواضح أنه على الرغم من انتشار جينات العائلة الجينية الواحدة فى الجينوم فى الكائنات حقيقية النواة إلا أنه يحدث تنظيم للتعبير الجيني لهذه الجينات بطريقة تعاونية حيث يحدث تعبير جيني لمجموعة من هذه الجينات وعدم التعبير الجيني للمجموعة الأخرى من الجينات فى نفس الوقت استجابة لمنبه مشترك. ومن الواضح أيضاً أنه يوجد عدد قليل من الجينات التى تنظم وتتحكم فى التعبير الجيني والتى تنشط أو تكبت (Repress) عدد من الجينات الأخرى التى تحمل خصائص مشتركة.



شكل (٢٥): يوضح طرز الجينات الكاذبة (Pseudogenes)

- A-** الموقع الجيني للألفاجلوبين على الكروموسوم رقم ١٦ في الإنسان والذي يضم الجينات الفعالة وظيفياً $\alpha E1$ و $\alpha A1$ و $\alpha A2$ والجينين الكاذبين $\alpha E'$ و $\alpha A'$.
- B-** الجين Mt-IIA الفعال وظيفياً والذي يحتوى على إنترونين بالإضافة الى ثلاثة إكزونات بينما الجين الكاذب Mt-IIB لا يحتوى على أى إنترونات ويشابه فى تركيبه mRNA الناضج الناتج عن نسخ الجين Mt-IIA.

الجينات الكاذبة Pseudogenes

الجينات الكاذبة هي نسخ من الجينات المكررة ولكنها غير فعالة وظيفياً وغالباً لا يحدث نسخ للجينات الكاذبة. وتوجد الجينات الكاذبة في كل أنواع الجينات في الكائنات حقيقية النواة سواء تلك التي تنسخ وتترجم إلى الأنواع المختلفة من البروتينات الخلوية أو تلك التي تنسخ فقط إلى الأنواع الأخرى المختلفة من الـ RNA، مثل الـ rRNA و tRNA و scRNA. ويختلف عدد الجينات الكاذبة باختلاف الجينات، فعلى سبيل المثال، فالجينات الصغيرة التي ينسخها كل من إنزيم البلمرة pol I و pol II غالباً ما تحتوي على مئات من الجينات الكاذبة بينما الجينات التي تنسخ وتترجم إلى الأنواع المختلفة من البروتينات الخلوية تحتوي عادة على عدد قليل من الجينات الكاذبة أقل من ٢٠ جين كاذب. وتنقسم الجينات الكاذبة إلى طرازين هما:

١- الجينات الكاذبة المماثلة في التركيب للجين الأصلي وهذا النوع من الجينات الكاذبة تكون مرتبطة بالجين الأصلي ومماثلة له في التركيب. وألية تكوين هذا الطراز من الجينات الكاذبة هو حدوث تكرار متتالي لمنطقة من الكروموسوم التي تحتوي على الجين الأصلي ومن أمثلة هذا الطراز من الجينات الكاذبة الموقع الجيني لجين الألفاجلوبين (α -globin) في الإنسان حيث يحتوي هذا الموقع على ثلاثة جينات فعالة وظيفياً هي (شكل ٢٥).

أ- الجين $\alpha E1$ ويظهر التعبير الجيني له في المراحل الجنينية

ب- الجين $\alpha A1$ والجين $\alpha A2$ ويظهر التعبير الجيني لهما في الفرد البالغ، كما يضم هذا الموقع الجيني جينين كاذبين هما $\alpha A'1$ و $\alpha E'$ ومن المحتمل نشأتهما من الجين الأصلي منذ ٤٥ مليون سنة ويرجع السبب في كونها غير فعالة وظيفياً إما لحدوث طفرات متعددة في الجين الكاذب تسبب تغير في الشفرات الوراثية أو إلى حدوث طفرة واحدة ينتج عنها تكوين أحد شفرات إنهاء الترجمة وبالتالي تكوين بروتين غير كامل.

٢- الجينات الكاذبة المشتقة من الـ mRNA الناضج (Mature mRNA) والنتائج من نسخ الجين الأصلي، وعلى ذلك فإنها لا تحتوي على الإنترونات التي توجد في الجين الأصلي ومن أمثلة هذا الطراز من الجينات الكاذبة الجين الكاذب (Metallothionin (Mt-IIB في الإنسان، والذي لا يحتوي على إنترونات بينما الجين الأصلي (Mt-IIA) يحتوي على إنترونين (شكل ٢٥).

الترانسبوزونات The Transposons

بالإضافة للجينات التي توجد في جينومات الكائنات الحية، فإنه توجد طرز خاصة من التتابعات النيوكليوتيدية الطويلة أو القصيرة والتي تنتشر في الجينوم وتعرف بالترانسبوزونات وتتميز بالخصائص التالية:

- ١- يتراوح طول كل تتابع نيوكليوتيدي منها ما بين ٢٠٠٠ إلى ٧٠٠٠ نيوكليوتيدة.
- ٢- أكثر حركة (Mobile) وتنقل داخل الجينوم ولها القدرة على التنقل من مكان إلى آخر داخل نفس الجينوم وقد تكون هذه الحركة أو التنقل لمدة جيل واحد أو لعدد من الأجيال.
- ٣- تتوزع بطريقة عشوائية داخل الجينوم أثناء حركتها وتنقلها.
- ٤- قد تسبب عند تحركها وتنقلها داخل الجينوم حدوث طفرات والتي أدت إلى اكتشافها لأول مرة بواسطة عالمة Barbara McClintock في الذرة في الستينات من القرن العشرين وأطلقت عليها اسم العناصر المتنقلة (Transposable elements).
- ٥- يمكن الاستدلال على وجود الترانسبوزونات وتنقلها داخل الجينوم بمقارنة مناطق الـ DNA في السلالات المختلفة لنفس الكائن.
- ٦- أمكن عزل الترانسبوزونات من عديد من الكائنات حقيقية النواة ووجد أنها تقع في عديد من الأقسام تبعاً لتركيبها وليس معروفاً حتى الآن آلية أو ميكانيزم تنقل الترانسبوزونات داخل الجينوم ولكن من الواضح أن المحتوى الوراثي للكائن يلعب دوراً في هذه الآلية.
- ٧- كل الترانسبوزونات يوجد على جانبيها تتابعات نيوكليوتيدية قصيرة متكررة من الـ DNA والتي يعتقد أنها تمثل المناطق التي يحدث عندها الكسر الذي تتطلبه عملية انتقال واندماج الترانسبوزونات في مكان آخر داخل الجينوم لكائن ما.

الساتلايت DNA Satellite DNA

بالإضافة لوجود الجينات والترانسبوزونات فى جينومات الكائنات حقيقية النواة يوجد طراز معين من التتابعات النيوكليوتيدية والتي تسمى بالساتلايت DNA وهو ذلك التتابع من النيوكليوتيدات الذى يحتوى على نفس التركيب من النيوكليوتيدات مسبباً ذلك لأن يكون حزمه من الـ DNA يمكن تمييزها عن باقى الـ DNA بواسطة عدد من الطرق المتنوعة للطرد المركزى ومن ثم جاءت تسميته بالساتلايت DNA ويتميز بما يلى:

- ١- أنها تتابعات نيوكليوتيدية متكرره بمعدل عالى فى صورة مكررات طويلة متتالية تصل إلى آلاف من المكررات المتشابهه نسبياً فى التركيب.
- ٢- يتراوح طول كل مكرره منها ما بين مكررات قصيرة تحتوى ما بين ٦ إلى ٢٠٠ نيوكليوتيدة الى مكررات طويلة تحتوى على الآلاف من النيوكليوتيدات.
- ٣- عادة ما يوجد بعض الاختلافات البسيطة بين هذه التتابعات المتكررة والذي من المحتمل أنها تعكس تطور هذا الساتلايت DNA بواسطة التكرار المتتالى متبوعاً بحدوث الطفرات أو حدوث النقص (Deletion).
- ٤- تختلف كمية الساتلايت DNA فى الكائنات حقيقية النواة ما بين ٢% الى ٥٠% من كمية الـ DNA الكلية بالجينوم كما أنها تختلف بين الأنواع قريبة الصلة من بعضها فعلى سبيل المثال تمثل كمية الساتلايت DNA فى الدروسوفيلا فيرليز *Drosophila virilis* بحوالى ٤٠% من كمية الـ DNA الكلية بينما فى الدروسوفيلا ميلانوجستر *Drosophila melanogaster* تصل كميته الى حوالى ٨% من كمية الـ DNA الكلية بالجينوم.
- ٥- عدد من طراز الساتلايت DNA تحيط بالسنتروميرات (Centromeres) والتلوميرات (Telomeres) حيث تظهر بالميكروسكوب الضوئى كمناطق شديدة الصبغ تعرف باسم الهتروكروماتين (Heterochromatin) فى كروموسومات الدور الاستوائى (Metaphase) من الانقسام الميتوزى عند صبغ الخلايا المنقسمة بصبغة الفولوجين.
- ٦- عادة لا يحدث نسخ (Transcription) للـ DNA التابع (Satellite DNA).

المينى ساتلايت DNA Mini-Satellite DNA

تحتوى أيضاً جينومات الكائنات حقيقية النواة بالإضافة للجينات والترانسبوزونات والساتلايت DNA على ما يعرف باسم المينى ساتلايت DNA (Mini-Satellite DNA) وهى تتابعات نيوكليوتيدية تتميز بالخصائص:

١- تتركب من عدد قليل فقط من المكررات المتتالية ذات التركيب البسيط والذى ينتشر فى الجينوم.

٢- يتميز بوجود اختلافات كبيرة فى عدد المكررات المتتالية باختلاف الأفراد فقد يكون عدد هذه المكررات المتتالية طويل فى فرد وقصير فى فرد آخر عند نفس الموقع من الـ DNA وهذه الاختلافات تستخدم لعمل بصمة خاصة من الـ DNA لكل فرد والتي يمكن استخدامها فى التحاليل الوراثية الأخرى.

تنظيم الجينوم Genome Organization

يمكن تعريف الجينوم Genome بأنه العدد الاحادى من الكروموسومات (Haploid number) فى أى كائن من الكائنات حقيقية النواة ويرمز له بالرمز n وهذا العدد الاحادى هو الذى يتواجد فى الجاميطات المذكرة والمؤنثة. ونظراً لأن الكائنات غير حقيقية النواة (البكتيريا) يتواجد فيها نسخة واحدة (One copy) فقط من الجينوم فإنها تسمى (Monoploid) وليست (Haploid) لأنها لا تتكاثر جنسياً ولا تكون جاميطات مذكرة أو مؤنثة.

قيمة الـ C-Value

تعرف قيمة الـ C-Value بأنها كمية الـ DNA فى الجينوم الاحادى (Haploid genome) فى الكائنات حقيقية النواة وتختلف هذه القيمة باختلاف الكائنات حقيقية النواة ففى الخميرة *S. cerevisiae* تقدر هذه القيمة بحوالى 10^9 زوج من النيوكليوتيدات وفى بعض البرمائيات تصل الى 10^{11} زوج من النيوكليوتيدات بينما فى الكائنات حقيقية النواة الراقية تكون هذه القيمة أكبر بكثير من تلك الكمية من الـ DNA الضرورية لقيام هذه الكائنات بوظيفتها. فعلى سبيل المثال تكون هذه القيمة الـ C-Value لجينوم الإنسان الاحادى حوالى 3×10^9 زوج من النيوكليوتيدات.

ولقد أوضحت تقديرات عدد الجينات فى الإنسان باستخدام طرق متعددة ومتنوعة أن عدد الجينات أقل من تلك الكمية بكثير وأن هناك زيادة فى كمية الـDNA فى الجينوم الأحادى تعادل عشرة أضعاف تلك الكمية من الـDNA اللازمة لقيام الإنسان بوظيفته الطبيعية.

ولقد وجد أن هذه القيمة الـC-Value داخل قسم ما بين الكائنات حقيقية النواة تتراوح من قيمة دنيا (Minimum) الى قيمة قصوى (Maximum) وأن القيمة القصوى تعادل مائة ضعف القيمة الدنيا داخل قسم ما من الكائنات حقيقية النواة، وهذا المجال الواسع لهذه القيمة فى قسم ما من الكائنات حقيقية النواة تعرف باسم (C-value paradox) .

وعموماً فإن قيمة الـC-Value تزداد كلما ازداد حجم الجينوم (جدول ٢)

جدول (٢): يوضح حجم الجينوم فى بعض الكائنات مقراً بالكيلو لأزواج القواعد (kbp)

الكائن Organism	حجم الجينوم Size of genome (kbp)
SV40	5.1
Vaccinia virus	190
E. coli	4000
S. cervisie	13500
Drosophila	165000
Man	2900000

وعلى الرغم من اختلاف هذه القيمة C-value باختلاف أنواع الكائنات المختلفة والتي تزداد مع زيادة الكائنات فى التعقيد إلا أن هذه الكمية (C-value) تكون ثابتة فى أفراد النواع الواحد سواء كان نبات أو حيوان وهذه هى إحدى الحقائق العلمية المؤكد حتى الآن.

الباب الثالث

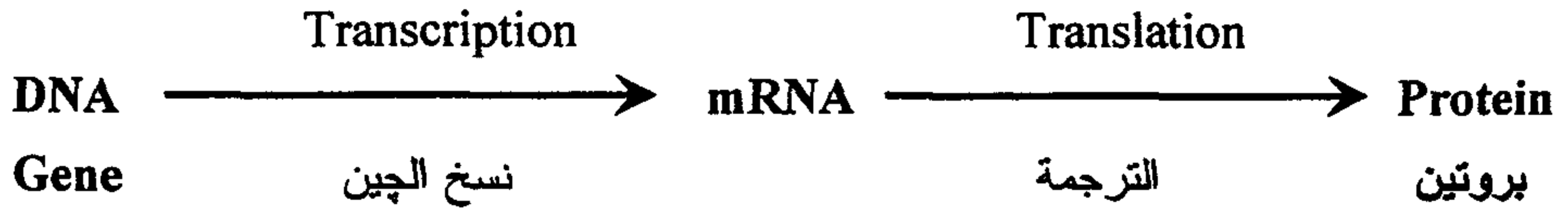
الشفرة الوراثية والتخليق الحيوي للبروتين

The Genetic Code and Protein Biosynthesis

The Genetic Code

أولاً: الشفرة الوراثية

مما لا شك فيه أن التعبير الجيني للجينات يتم من خلال إنتاج الجينات للبروتينات الخلوية عن طريق نسخ (Transcription) الجين وتكوين mRNA والذي يترجم (Translation) بواسطة الريبوسومات إلى البروتين على النحو التالي:



ونظراً لأن أي بروتين يتكون من عدد معين وبترتيب ثابت ومحدد من الأحماض الأمينية فإن تتابع وترتيب القواعد في جزيء mRNA هو الذي يحدد ويملي عدد وطبيعة الأحماض الأمينية في البروتين الناتج ونظراً لأن أي جين (Gene) يتكون من تتابع معين ومحدد من القواعد الأربعة وهي الأدينين (A) Adenine والجوانين (G) Guanine والسيتوسين (C) Cytosine والثيمين (T) Thymine والتي يختلف عددها وترتيبها باختلاف الجينات فإن السؤال الذي يطرح نفسه هو:

كيف يمكن للأنواع الأربعة من القواعد السابقة أن تعبر عن الأحماض الأمينية الأساسية العشرين والتي تدخل في بناء وتركيب كل الأنواع المختلفة من البروتينات الخلوية؟

ويعتبر العالم جورج جامو (George Gamow) هو أول من قدم تصوراً نظرياً للإجابة على السؤال السابق حيث أقترح أن التعبير عن الأحماض الأمينية المختلفة فى البروتين يكون من خلال شفرة وراثية Genetic Code تتركب من تتابع محدد وثابت من ثلاثة قواعد من القواعد الأربعة و السابقة الذكر والتي تدخل فى تركيب الجين وذلك للأسباب التالية:

١- إذا عبرت كل قاعده واحدة من القواعد الأربعة (C, T, G, A) عن حامض أمينى فسوف تتكون أربعة شفرات (Codons) فقط كل منها تعبر عن حامض أمينى معين، وهذا العدد من الشفرات لا يكفى للتعبير عن كل الأحماض الأمينية العشرين.

٢- إذا عبرت كل قاعدتين من القواعد الأربعة (4^2) عن حامض أمينى معين فسوف تتكون ١٦ شفرة لتعبر عن ١٦ حامض أمينى، وأيضاً هذا العدد من الشفرات مازال غير كافى للتعبير عن كل الأحماض الأمينية العشرين.

٣- إذا عبرت كل ثلاثة قواعد من القواعد الأربعة (4^3) عن حامض أمينى معين فسوف نحصل على ٦٤ شفرة، وهذا العدد من الشفرات يكون كافياً للتعبير عن الأحماض الأمينية العشرين.

تعيين وتحديد الشفرة الوراثية

Determination and Identification of the Genetic Code

يعتبر تعيين وتحديد الشفرات الوراثية المختلفة للأحماض الأمينية العشرين من أهم الإنجازات العلمية التى تحققت فى الستينات من القرن العشرين وذلك عن طريق الأبحاث التى أجراها العالمين نيربرج (Nirenberg) وكورانا (Khorana) عام ١٩٦١ حيث استخدمتا طرق بحثية مختلفة لحل لغز الشفرة الوراثية وتتلخص هذه الطرق فيما يلى:

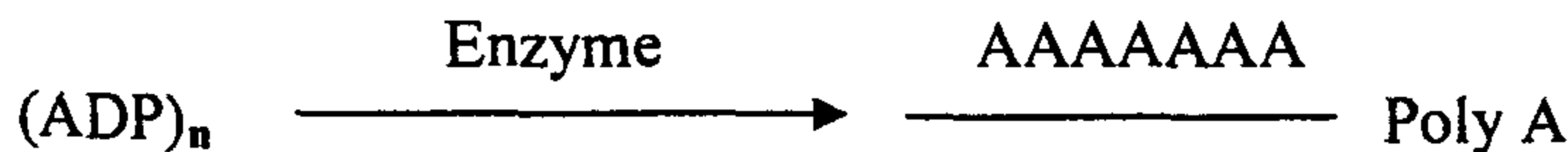
١- طريقة تخليق خيط من الـ RNA صناعياً (Artificial RNA) يتركب من نوع واحد من القواعد.

ففى عام ١٩٦١ اكتشف العالم (Nirenberg) إنزيم بكتيرى فى البكتيريا *E. coli* يسمى (Polyribonucleotide phosphorylase) يستطيع تحفيز تخليق خيط من الـ RNA فى أنبوبة الاختبار فى وجود الوحدات البنائية الأربعة فى صورة ثنائية الفوسفات وهى UDP, CDP, GDP, ADP وذلك دون الحاجة إلى وجود خيط مطبعى يستخدمه هذا الإنزيم لتخليق خيط الـ RNA من هذه الوحدات البنائية. كما وجد هذا العالم أيضاً أنه إذا وضع هذا الخيط من الـ RNA الصناعى فى أنبوبة اختبار تحتوى على مكونات النظام اللازم لتخليق البروتين من ريبوسومات وإنزيمات وكل الأحماض الأمينية العشرين وكل الـ tRNA فإنه يتكون سلسلة عديدة الببتيد (Polypeptide chain) يمكن عزلها وفصلها وتنقيتها ومعرفة ترتيب وتتابع الأحماض الأمينية بها. ولقد استخدم هذا العالم هذه الطريقة لتخليق خيوط من الـ RNA الصناعية يحتوى كل منها على نوع واحد من القواعد فقط على النحو التالى:

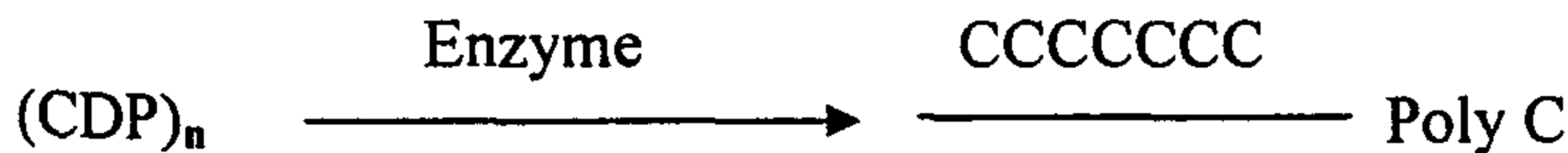
أ- تخليق خيط من الـ RNA يتكون فقط من عديد من قواعد اليوراسيل (PolyU)



ب- تخليق خيط من الـ RNA يتركب فقط من عديد من قواعد الأدينين (Poly A)

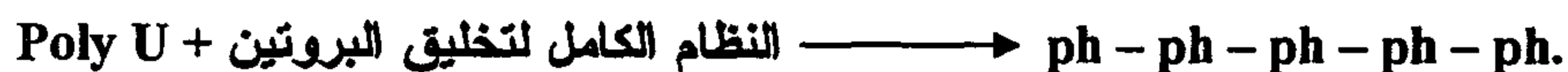


ج- تخليق خيط من الـ RNA يتركب من عديد من قواعد السيتوسين (Poly C)



ولم يتمكن هذا العالم من تخليق خيط الـ RNA يتركب من الجوانين فقط (Poly G) وذلك لوجود صعوبات فنية ولقد استخدم هذه الخيوط من الـ RNA المخلقة صناعياً فى تخليق سلاسل عديدة الببتيد بوضع كل منهما بمفرده فى أنبوبة اختبار تحتوى على كل المكونات اللازمة لتخليق البروتين السابق ذكرها وكانت النتائج على النحو التالى:

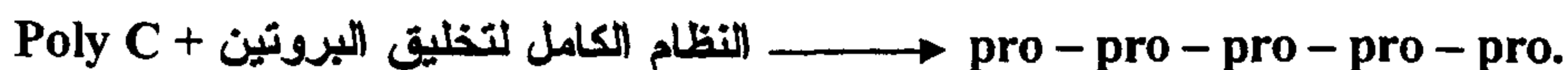
أ- عند استخدام خيط الـ RNA المكون من اليوراسيل فقط (Poly U) تكونت سلاسل عديدة الببتيد تتركب من الحامض الأمينى فينيل ألانين (Phenylalanine (ph) فقط وبذلك استنتج أن الشفرة (Codon) الخاصة بهذا الحامض الأمينى هى ثلاثية من اليوراسيل (UUU)



ب- عند استخدام خيط الـ RNA المكون من عديد من قواعد الأدينين (Poly A) فقط تكونت سلاسل عديدة الببتيد تتركب من الحامض الأمينى الليسين (Lysine (lys) فقط وبذلك استنتج أن الشفرة (Codon) الخاصة بهذا الحامض الأمينى هى ثلاثية من الأدينين (AAA)



ج- عند استخدام خيط الـ RNA المكون من عديد من قواعد السيتوسين (Poly C) فقط تكونت سلاسل عديدة الببتيد تتركب من الحامض الأمينى البرولين (Proline (pro) فقط وبذلك استنتج أن الشفرة (Codon) الخاصة بهذا الحامض الأمينى هى ثلاثية من السيتوسين (CCC)

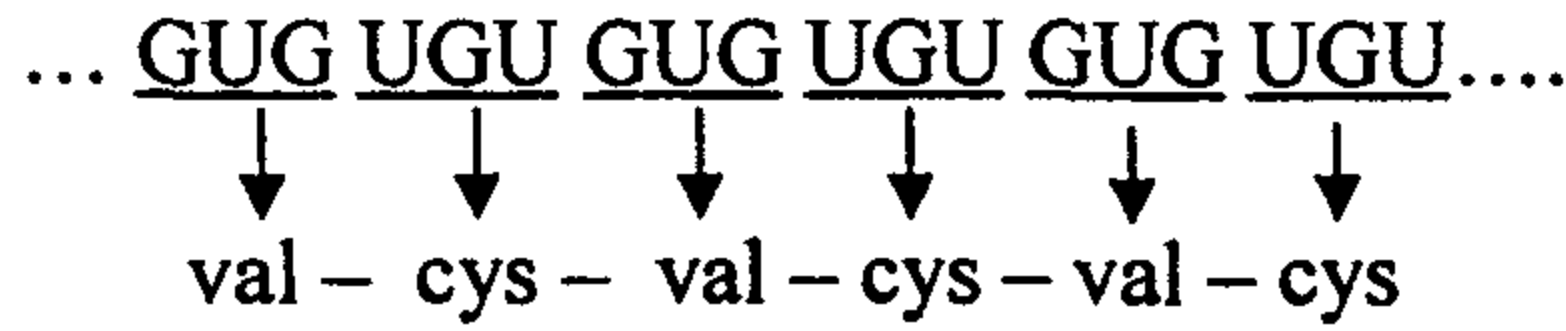


٢- طريقة تخليق خيط من الـ RNA يتركب من ترتيب معروف من نوعين من القواعد فقط بصورة متبادلة.

وفى هذه الطريقة استخدمت كل من الطرق الإنزيمية والتخليق الكيميائى فى تخليق خيط طويل من الـ RNA يتركب من الجوانين (G) واليوراسيل (U) فقط على سبيل المثال على النحو التالى

..... GUGUGUGUGUGUGUGU.....

وعند وضع هذا الخيط من الـ RNA فى أنبوبة اختبار تحتوى على كل النظام الكامل لتخليق البروتين تكونت سلاسل عديدة الببتيد تتركب من نوعين من الأحماض الأمينية فى صورة متبادلة هما الفالين (Valine (val) والسستين (Cystein (cys) كما يلى:



وبذلك استنتج هذا العالم أن الشفرة الوراثية للحامض الأمينى الفالين هى (GUG) بينما الشفرة الوراثية للحامض الأمينى السستين هى (UGU).

٣- طريقة تخليق خيط من الـ RNA صغير جداً يتركب من ثلاثة قواعد فقط والتي تعرف

باسم الرسالة الصغيرة Mini-messenger RNA

وجد أن جزيئات خيط الـ RNA الصغيرة جداً والتي تتركب من ثلاثة قواعد فقط يستطيع الريبوسوم (Ribosome) الارتباط بها وبالتالي ارتباط الحامض النووى الناقل tRNA وما يحمله من حامض أمينى بهذه الرسالة الصغيرة وبذلك يمكن فصل المركب المكون من الريبوسوم والـ tRNA وما يحمله من حامض أمينى عن باقى المكونات الأخرى التى تمثل كل النظام الكامل لتخليق البروتين ومن ثم يمكن تحديد الحامض الأمينى الذى يرتبط بمثل هذه الشفرة (Codon) الثلاثية. ولقد تم تخليق مثل هذه الشفرات (Codon) الثلاثية والتي تتركب من ثلاثة قواعد فقط بترتيب معين ومعروف حيث أمكن تخليق كل الأربعة وستون (٦٤) شفرة (Codon)

ثلاثية والتي تمثل كل التوافق الممكنة بين القواعد النيتروجينية الأربعة ($4^3 = 64$) باستخدام الطرق الكيميائية. فعلى سبيل المثال وجد أن الشفرة الثلاثية GUG يرتبط بها الريبوسوم والحامض النووي الناقل tRNA الذي يحمل الحامض الأميني الفالين (Valine). وبهذه الطريقة أمكن تحديد كل الشفرات (Codons) للأحماض الأمينية الأساسية العشرين. كما أكدت هذه الطريقة طبيعة الشفرة الثلاثية (جدول ٣).

جدول (٣) : الشفرات الوراثية Genetic codons للأحماض الأمينية الأساسية العشرين.

	Second letter				
	U	C	A	G	
First letter	U	UCU } UCC } UCA } UCG } Ser	UAU } UAC } UAA } UAG } Tyr Stop Stop	UGU } UGC } UGA } UGG } Cys Stop Trp	Third letter
	C	CUU } CUC } CUA } CUG } Leu	CCU } CCC } CCA } CCG } Pro	CAU } CAC } CAA } CAG } His Gln	
	A	AUU } AUC } AUA } AUG } Ile Met	ACU } ACC } ACA } ACG } Thr	AAU } AAC } AAA } AAG } Asn Lys	
	G	GUU } GUC } GUA } GUG } Val	GCU } GCC } GCA } GCG } Ala	GAU } GAC } GAA } GAG } Asp Glu	
				GGU } GGC } GGA } GGG } Gly	

ويلاحظ أن شفرة البداية AUG تعبر عن الحامض الأميني ميثيونين (Methionine) وثلاثة شفرات لإنهاء الترجمة (UAA أو UAG أو UGA). كذلك يلاحظ أن جميع الأحماض الأمينية يعبر عنها ما بين شفرتين (Codons) إلى ستة شفرات باستثناء الحامض الأميني التربوفان (Tryptophan) يعبر عنه بشفرة واحدة وهي (UGG).

مرادفات الشفرة الوراثية Synonymous In The Genetic Code

مع حلول عام ١٩٦٤ أمكن معرفة الشفرات (Codons) الأربعة وستون ووجد من بينها شفرة البداية (Initiation codon) وهي الشفرة (AUG) وثلاثة شفرات أخرى تمثل شفرات إنهاء الترجمة (Stop codons) وهي الشفرات (UAG) أو (UAA) أو (UGA). ونظراً لوجود ٦١ شفرة وراثية مختلفة وأنه يوجد عشرين حامض أميني فقط فسوف يوجد أكثر من شفرة واحدة لتعبر عن نفس الحامض الأميني وهذا ما يعرف بالمرادفات في الشفرة الوراثية فعلى سبيل المثال يعبر عن الحامض الأميني البرولين (Proline) بأى شفرة من الشفرات الأربعة (CCA) أو (CCG) أو (CCC) أو (CCU). كذلك وجد أن الشفرات المختلفة التي تعبر عن نفس الحامض الأميني تختلف عن بعضها في القاعدة الثالثة من يمين الشفرة وأن هذه الظاهرة شائعة بالنسبة لكل الأحماض الأمينية التي يعبر عنها بأكثر من شفرة. ولقد أكدت الأبحاث أن عدد الأحماض النووية الناقلة tRNAs الموجودة بالخلية أقل بكثير عن عدد الشفرات الوراثية وبذلك يستطيع الحامض النووي الناقل tRNA الخاص بنقل حامض أميني معين التعرف على هذه الشفرات المختلفة لنفس الحامض الأميني حيث يكون للقاعدة الثالثة في يمين الشفرة المضادة (Anticodon) الموجودة بالتRNA درجة من الترنح (Wobble) تسمح لها بالاقتران مع القاعدة الثالثة في يمين الشفرة (Codon). فعلى سبيل المثال يعبر عن الحامض الأميني البرولين بأى شفرة من الشفرات (CCA) أو (CCG) أو (CCC) أو (CCU) وأن الشفرة المضادة (Anticodon) الموجودة في التRNA الذي يحمل هذا الحامض الأميني هي (GGU) وبذلك تستطيع القاعدة يوراسيل U في هذه الشفرة المضادة الاقتران بالأدينين (A) أو الجوانين (G) أو السيتوسين (C) أو اليوراسيل (U) والتي تمثل القاعدة الثالثة في يمين الشفرات (CCA) أو (CCG) أو (CCC) أو (CCU) وتعرف هذه الظاهرة بنظرية الترنح (Wobble hypothesis) في الشفرة الوراثية وهذا يفسر قلة الأحماض النووية الناقلة tRNAs بالخلية عن عدد الشفرات الوراثية. ووجود المرادفات وكذلك ظاهرة الترنح في الشفرة الوراثية يؤدي إلى انخفاض التأثير الضار الناشئ عند حدوث الطفرة عند مستوى زوج من القواعد إلى أدنى مستوى له حيث أنه

قد تؤدي الطفرة إلى تكوين إحدى الشفرات المتعددة لنفس الحامض الأميني وعلى ذلك يمكن تلخيص أهم خصائص الشفرة الوراثية فى النقاط التالية:

١- يعبر عن الشفرة الوراثية (Genetic code) بتتابع معين ومحدد من ثلاثة قواعد على طول الرسالة الوراثية المحمولة بواسطة mRNA.

٢- لا توجد فواصل بين الشفرات الثلاثية المتتالية على طول الرسالة الوراثية (mRNA) تفصل بين شفرة وأخرى أو بين مجموعة من الشفرات الوراثية على طول الرسالة الوراثية (mRNA).

٣- يوجد ظاهرة المرادفات (Synonymous phenomena) فى الشفرة الوراثية والتي تعنى وجود أكثر من شفرة (Codon) مختلفة تعبر عن نفس الحامض الأميني.

٤- يوجد ظاهرة الترنح (Wobble hypothesis) فى الشفرة الوراثية والتي تعنى أن نفس الحامض النووي الناقل (tRNA) يستطيع التعرف على أكثر من شفرة لنفس الحامض الأميني.

٥- يبدأ دائما ترجمة الرسالة الوراثية (mRNA) بواسطة الريبوسوم عن طريق ارتباطه بشفرة بداية الترجمة (AUG) حيث يتم وضع أول حامض أميني فى السلسلة عديدة الببتيد وهو الحامض الأميني ميثيونين (Methionine) فى الكائنات حقيقية النواة والحامض الأميني فورمايل ميثيونين (Formyl methonine) فى الكائنات غير حقيقية النواة.

٦- تنتهى ترجمة الرسالة الوراثية mRNA بواسطة الريبوسوم عندما يصل إلى أى شفرة من شفرات إنهاء الترجمة الثلاثة (UAG أو UAA أو UGA) حيث لا يوضع أى حامض أميني فى السلسلة عديدة الببتيد عندما يصل الريبوسوم إلى أى شفرة من هذه الشفرات الثلاثة.

٧- الشفرة الوراثية غير متداخلة (Non-overlapping) بمعنى أن كل ثلاثة قواعد متتالية تمثل شفرة معينة وأن كل قاعدة فى هذه الشفرة هى جزء منها وليست أجزاء من شفرات متعددة.

عمومية الشفرة الوراثية Universality of the Genetic Code

على الرغم من أن معظم المعلومات حول الشفرة الوراثية من حيث طبيعتها وتحديداتها جاءت من الأبحاث التي أجريت على البكتيريا *E. coli* ، إلا أنه أمكن الحصول على نفس النتائج باستخدام كائنات أخرى مثل الأمفيبيا (Amphibia) والثدييات (Mammalian) وكذلك الأنسجة النباتية. ولقد أجمعت نتائج هذه الأبحاث على أن الشفرة الوراثية (Genetic code) عامة (Universal) في كل الكائنات الحية سواء الراقية أو غير الراقية وهذا يعنى أن الشفرة سواء في الفيرس أو الإنسان وهو أرقى الكائنات الحية ثابتة. وتقدم عمومية الشفرة الوراثية دليل قوى على أنه منذ أن وجدت الحياة على الأرض حيث ظهرت أول صور الحياة منذ ثلاثة بلايين عام حيث وجدت الشفرة الوراثية كان هناك انتخاب قوى تجاه هذه الشفرة لكى تستمر بدون تغير وذلك لأن التغير فى شفرة واحدة سوف يترتب عليه تغيير حامض أمينى ما فى كثير من البروتينات والذى سوف ينتج عنه تأثير ضار بالكائن وربما يكون لمثل هذه الطفرات تأثير مميت (Lethal) وهذا يفسر استمرار ثبات الشفرة الوراثية بدون تغير منذ أن بدأت الحياة على الأرض.

أنواع الطفرات التى تحدث فى الشفرة الوراثية Mutation in the Genetic Cod

فى عام ١٩٥٧ قدم العالم Veren Ingram أول دليل مباشر على أن الجينات تحمل الشفرات الخاصة لإنتاج البروتينات المختلفة وذلك بمقارنة تحليل بروتين الهيموجلوبين الطبيعى فى خلايا الدم الحمراء ببروتين هيموجلوبين خلايا الدم المنجليه فى الإنسان حيث وجد أن الاختلاف بينهما يرجع إلى إحلال الحامض الأمينى فالين (Valine) فى هيموجلوبين خلايا الدم المنجليه بالحامض الأمينى جلوتاميك (Glutamic) فى هيموجلوبين كرات الدم الحمراء الطبيعى. ولقد وجد أن هذا الإحلال للحامض الأمينى يرجع إلى حدوث طفرة فى شفرة الحامض الأمينى جلوتاميك (GAA) سببت هذه الطفره فى تكوين الشفرة (GUA) وهى شفرة الحامض الأمينى فالين ويمكن تقسيم الطفرات التى تحدث فى الشفرة الوراثية على النحو التالى:

١- الطفرات الساكنة (Silent mutations) وتنشأ هذه الطفرات الساكنة إذا حدث تغير للقاعدة الثالثة من يمين الشفرة الوراثية والذي ربما يؤدي هذا التغير إلى تكوين شفرة أخرى لنفس الحامض الأميني وذلك لوجود ظاهرة المرادفات فى الشفرة الوراثية وبذلك لن يحدث تغير للحامض الأميني رغم حدوث الطفرة وبالتالي لن يحدث تغير للبروتين الناتج. فعلى سبيل المثال إذا حدثت طفره فى الشفرة الوراثية للحامض الأميني بروتين (GGT) تسببت فى تغيير القاعدة الثالثة (T) إلى قاعدة الأدينين (A) وبالتالي تصبح هذه الشفرة بعد حدوث الطفرة هي GGA فإن هذه الشفرة مازالت تعبر عن نفس الحامض الأميني البرولين لوجود المرادفات فى الشفرة الوراثية.

٢- الطفرات الخاطئة المعنى (Miss-sense mutations) وينشأ هذا النوع من الطفرات إذا حدث التغير فى القاعدة الأولى شمال الشفرة والذي يترتب عليه إحلال حامض أميني محل آخر فى البروتين الناتج وبالتالي ينتج بروتين طافر. فعلى سبيل المثال إذا حدث تغير فى القاعدة الأولى فى شفرة الحامض الأميني بروتين (GGT) وهي الجوانين (G) ليحل محلها القاعدة أدينين (A) فسوف يتبع ذلك تغير هذه الشفرة تماماً لهذا الحامض الأميني البرولين ليحل محله الحامض الأميني السيرين (AGT) وبالتالي ينتج بروتين طافر.

٣- الطفرات ذات المعنى (Sense mutations) وينشأ هذا النوع من الطفرات إذا حدث تغير فى القاعدة الثالثة يمين الشفرة ترتب عليه تكوين إحدى شفرات إنهاء الترجمة المبكرة والذي يترتب عليه تكوين بروتين غير كامل التكوين ويصبح بروتين طافر فعلى سبيل المثال إذا حدث تغير فى القاعدة الثالثة يمين الشفرة ATG بإحلال السيتوسين (C) محل الجوانين (G) فإنه يترتب على ذلك تكوين إحدى شفرات إنهاء الترجمة المبكرة (ATC) وبالتالي يتوقف استمرار تكوين البروتين ويتكون بروتين ناقص (بروتين طافر).

٤- طفرات تغيير القالب الشفرى (Frameshift mutations) ينشأ هذا النوع من الطفرات إما عن طريق إضافة (Addition) قاعدة واحدة أو نقص (Deletion) قاعدة واحدة عن طريق الخطأ عند تضاعف الـ DNA وفى كلا الحالتين يحدث تغير كامل لكل الشفرات أو غالبيتها تبعاً لمكان النقص أو الإضافة وبالتالي يتكون بروتين طافر.

Evolution of the Genetic Code**تطور الشفرة الوراثية**

على الرغم من أن الشفرة الوراثية عامة وثابتة فى جميع الكائنات الحية والفيروسات إلا أنه توجد نظريتين لمنشأ الشفرة الوراثية هما:

١- **نظرية الحفظ بالصدمة (Frozen accident theory)** وتقترح هذه النظرية أن الشفرة الوراثية نشأت بالصدفة وأنها لم تتغير لأن الانتخاب كان فى صالح هذه الشفرات الوراثية مما أدى إلى ثباتها وعدم تغييرها .

٢- **النظرية التطورية (Evolutionary theory)** وتقترح هذه النظرية أن الشفرات الوراثية المختلفة نشأت وتطورت وأشتقت من شفرات وراثية أولية. ومع ذلك فإن النظرية الأولى هى الأكثر قبولاً وتأييداً على الرغم من أن الشفرات الحالية يحتمل أنها ليست هى الأفضل بالنسبة للكائنات الحية فعلى سبيل المثال يوجد ستة شفرات مختلفة للحامض الأمينى الأرجنين (Arginine) بينما الإحتياج الحقيقى لهذا الحامض الأمينى فى البروتينات المختلفة هو يكفى وجود شفرتين أو ثلاثة للتعبير عنه وكذلك فإن الحامض الأمينى الليسين (Lysine) له شفرتين مختلفتين بينما الإحتياج الحقيقى لهذا الحامض الأمينى يتطلب وجود أكثر من شفرتين له وذلك لتواجده فى معظم البروتينات الخلوية. ومهما يكن الحدث الذى حدث بالنسبة لمنشأ الشفرة الوراثية فإن نظرية منشأ الشفرة الوراثية وحفظها بالصدفة كان بمثابة حدث قاطع وذلك لأن الأحماض الأمينية هى المسؤولة عن تكوين البروتينات فى كل الكائنات الحية والموجودة حالياً على الأرض.

Protein Biosynthesis**ثانياً: التخليق الحيوى للبروتين**

من المعروف أن معظم الجينات تبدى تأثيرها من خلال إنتاجها للبروتينات سواء كانت بروتينات تركيبية وهى التى تدخل فى بناء مكونات الخلية أو مكونات الأنسجة والأعضاء المختلفة للكائن الحى أو قد تكون بروتينات وظيفية وهى التى تقوم بوظيفة داخل الخلية مثل الإنزيمات. وتعتبر البروتينات جزيئات كبيرة معقدة التركيب حيث يبدى بعضها درجة عالية من التخصص الوظيفى مثل الإنزيمات التى تحفز التفاعلات الكيميائية الحيوية المختلفة بالخلية، وهذا يبين ويوضح لماذا يكون للجين عادة تأثير متخصص أو تأثير محدد على الشكل المظهرى (Phenotype) للكائن.

وعموماً تتركب البروتينات إما من نوع واحد من السلاسل عديدة الببتيد أو أكثر من نوع واحد من السلاسل عديدة الببتيد كما فى حالة بروتين الجلوبيين (Globin) فى الإنسان حيث يتركب جزيء الجلوبيين الكامل والفعال وظيفياً من أربعة سلاسل عديدة الببتيد اثنين منهما متماثلين ومتطابقين وتسمى السلاسل عديدة الببتيد ألفا (α -chains) واثنين آخرين متماثلين ومتطابقين وتسمى السلاسل عديدة الببتيد بيتا (β -chains) وتتركب السلسلة ألفا (α -chain) من ١٤١ حامض أميني بتتابع معين ومحدد بينما تتركب السلسلة بيتا (β -chain) من ١٤٦ حامض أميني بتتابع محدد أيضاً. وبذلك يوجد جينين هما الجين A والذي ينسخ ويترجم إلى السلاسل عديدة الببتيد ألفا (α -chains) والجين B والذي ينسخ ويترجم إلى السلاسل عديدة الببتيد بيتا (β -chains).

وتتركب السلسلة عديدة الببتيد من تتابع معين ومحدد من الأحماض الأمينية والتي ترتبط ببعضها عن طريق عديد من الروابط الببتيدية (Peptide bonds) بين مجموعة الكربوكسيل فى أول حامض أميني مع مجموعة الأمينو فى الحامض الأميني الثانى وهكذا يتوالى تكوين هذه الروابط الببتيدية على طول السلسلة عديدة الببتيد حيث تنتهى السلسلة عديدة الببتيد بحامض أميني يحتوى على مجموعة كربوكسيل حرة بينما تبدأ هذه السلسلة عديدة الببتيد بحامض أميني يحتوى على مجموعة أمينو حرة. وعموماً يوجد عشرون حامض أميني أساسى (شكل ٢٦) تدخل فى بناء وتركيب كل البروتينات الخلوية الطبيعية وتختلف هذه البروتينات عن بعضها فيما يلى:

- ١- عدد وأنواع السلاسل عديدة الببتيد فى كل بروتين.
- ٢- عدد وتتابع أو ترتيب الأحماض الأمينية فى السلسلة الواحد حيث يتراوح عددها فى السلسلة الواحد ما بين ٥١ حامض أميني كما فى بروتين هرمون الأنسولين (Insulin) إلى أكثر من ١٠٠٠ حامض أميني كما فى بروتين الفيبروين (Fibroin) وهو بروتين الحرير الطبيعى ويعرف ترتيب وتتابع الأحماض الأمينية فى السلسلة عديدة الببتيد بالتركيب الأولى (Primary structure) للبروتين وهذا الترتيب يحدده ويمليه ترتيب القواعد الأربعة (C, G, T, A) فى جين ما وسوف نتناول فيما يلى الآلية التى يتم من خلالها التعبير الجيني للجينات من خلال التخليق الحيوى للبروتين والذي يحدث على مرحلتين هما:

أولاً: نسخ الجين Gene Transcription

وهى العملية التى يتم بواسطتها نسخ وانتقال المعلومات الوراثية الموجوده فى جين ما (التتابع النيوكليوتيدى فى الجين) إلى السيتوبلازم عن طريق نسخ الحامض النووى الرسول Messenger RNA (mRNA) . وتتم عملية نسخ الجين بواسطة إنزيم البلمرة RNA polymerase والذى يستخدم الخيط الشفرى (Coding strand) من الجين وهو الخيط الذى إتجاهه 3' ← 5' كخيط مطبعى (Template) لتخليق خيط الـ mRNA والذى يتم تخليقه فى الإتجاه 5' ← 3' وذلك عن طريق الاقتران بين النيوكليوتيدات المكمله فى كل من الـ mRNA وخيط الـ DNA الشفرى وتكوين الرابطة فوسفودايستر (Phosphodiester) التى تربط النيوكليوتيدات ببعضها فى خيط الـ mRNA وسوف نتناول الطبيعة الكيميائية لنسخ الجين وتكوين جزيئات الـ mRNA الناضجة (Mature mRNA) فى الكائنات حقيقية النواة وكذلك نسخ الجينات فى الكائنات غير حقيقية النواة فيما بعد بالتفصيل (الباب الرابع) وبوجه عام تنتهى عملية نسخ الجين وتكوين جزيئات الأحماض النووية الرسول mRNAs وبعد انتهاء نسخ الجين وتخليق الـ mRNAs فإنه يترك النواة ويذهب إلى السيتوبلازم لترجمته إلى البروتين المناسب.

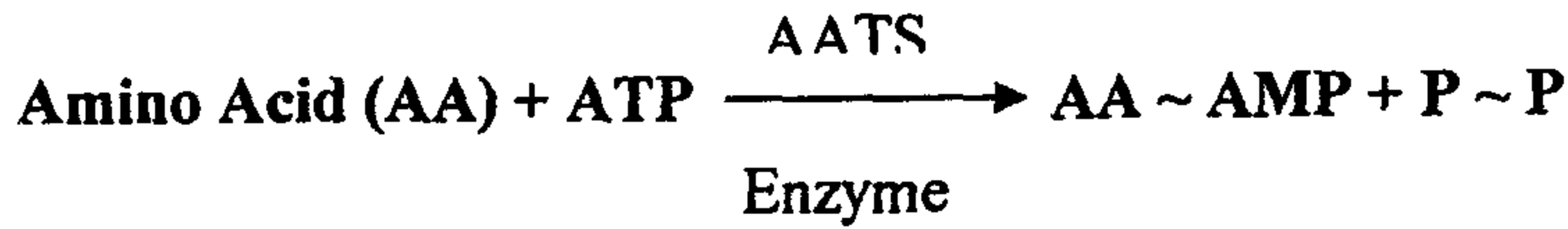
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{O}^- \end{array} \\ \\ (\text{CH}_2)_3 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{C}=\text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <p>Arginine (Arg / R)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{C} \\ \searrow \text{C} \end{array} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <p>Glutamine (Gln / Q)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{C} \\ \searrow \text{C} \end{array} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ <p>Phenylalanine (Phe / F)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{C} \\ \searrow \text{C} \end{array} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{OH} \end{array}$ <p>Tyrosine (Tyr / Y)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2 \end{array}$ <p>Tryptophan (Trp / W)</p>
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{O}^- \end{array} \\ \\ (\text{CH}_2)_4 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <p>Lysine (Lys / L)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{C} \\ \searrow \text{C} \end{array} \\ \\ \text{H} \end{array}$ <p>Glycine (Gly / G)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Alanine (Ala / A)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_4\text{H}_3\text{N}_2 \end{array}$ <p>Histidine (His / H)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$ <p>Serine (Ser / S)</p>
$\begin{array}{c} \text{H}_2 \\ \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{H}_2\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{O}^- \end{array} \end{array}$ <p>Proline (Pro / P)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$ <p>Glutamic Acid (Glu / E)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$ <p>Aspartic Acid (Asp / D)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Threonine (Thr / T)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array}$ <p>Cysteine (Cys / C)</p>
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Methionine (Met / M)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Leucine (Leu / L)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <p>Asparagine (Asn / N)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{HC} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Isoleucine (Ile / I)</p>	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Valine (Val / V)</p>

شكل ٢٦: يوضح تركيب الأحماض الأمينية العشرين الأساسية التي تدخل في تركيب البروتينات المختلفة. ويلاحظ أن كل حامض أميني يحتوي على مجموعة أمينو (Amino group NH_3^+) ومجموعة حامضية (Acid group COO^-).

ثانياً: ترجمة mRNA mRNA Translation

تمثل هذه العملية تدفق المعلومات الوراثية من الجينات عن طريق جزيئات (mRNA) إلى السيتوبلازم حيث تتغير لغة التعبير المستخدمة، فعند نقل المعلومات من الجين (DNA) وتكوين خيط mRNA تظل لغة التغيير المستخدمة كما هي والتي تتمثل في التتابع النيوكليوتيدي في كل من الخيط الشفري (Coding strand) من الجين وكذلك التتابع النيوكليوتيدي المكمل في خيط mRNA والذي يترجم إلى البروتين المناسب حيث تتغير لغة التعبير من التتابع النيوكليوتيدي في خيط mRNA إلى تتابع من الأحماض الأمينية في البروتين المناسب وتعرف هذه العملية بالترجمة (Translation). ومما لاشك فيه أن الأحماض الأمينية لا تستطيع بمفردها الذهاب إلى الريبوسومات (Ribosomes) الخلوية لتكوين البروتين المناسب وكذلك لا تستطيع بمفردها تحديد موقعها الدقيق في السلسلة عديدة الببتيد ولكي يتم إنجاز هذه المهمة داخل الخلية فإن ذلك يتم بمساعدة كل من الأحماض النووية الناقلة (tRNAs) وكذلك بعض الإنزيمات الخلوية والتي تتعرف على كل من الأحماض الأمينية وكذلك على الأحماض النووية الناقلة (tRNAs) التي تقوم بحمل ونقل الأحماض الأمينية ووضعها في مكانها الصحيح من السلسلة عديدة الببتيد وذلك لأحتواء هذه الإنزيمات على موقعين أحدهما للتعرف على الحامض الأميني والآخر للتعرف على الحامض النووي الناقل (tRNA) الذي يحمل هذا الحامض الأميني ويتم إنجاز هذه المهمة كما يلي (شكل ٢٧)

- تنشيط الأحماض الأمينية (Amino acids activation) نظراً لأن الأحماض النووية الناقلة tRNA هي التي تقوم بحمل ونقل الأحماض الأمينية ووضعها في مكانها الصحيح من السلسلة عديدة الببتيد عن طريق الريبوسومات (Ribosomes) الخلوية، فإن ذلك يتطلب تنشيط الأحماض الأمينية بالطاقة اللازمة التي يمكنها من الارتباط بالحامض النووي الناقل tRNA حيث يرتبط كل حامض أميني بالمركب الغني بالطاقة ATP بمساعدة إنزيمات (AATS) Amino acyl-tRNA synthetase على النحو التالي:

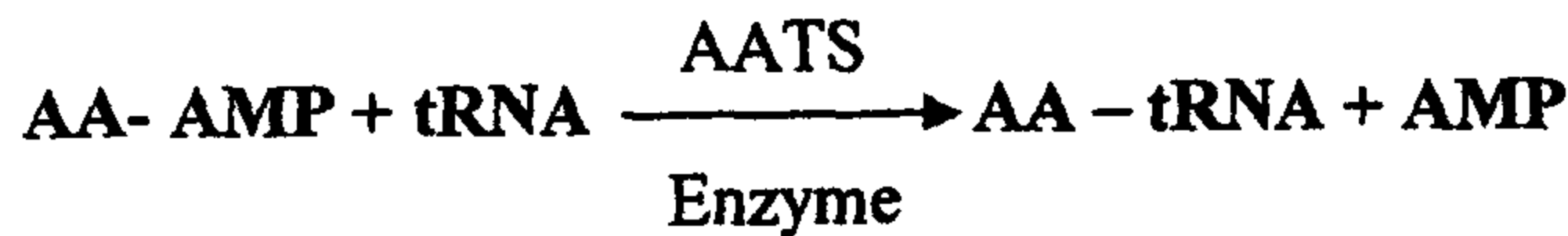


وبذلك يرتبط الحامض الأميني (AA) بالمركب الغنى بالطاقة (AMP) وهو الأدينوزين أحادى الفوسفات. وهذا الحامض الأميني المنشط يحتوى على الطاقة اللازمة لأرتباطه بالحامض النووى الناقل tRNA. وتحتوى الخلية الحية سواء فى الكائنات حقيقية النواة أو غير حقيقية النواة على عشرين نوع من إنزيمات الـ (AATS)، حيث يقوم كل نوع من هذه الإنزيمات بالتعرف على كل من:

أ- الحامض الأميني الذي يجب أن يساعد فى تنشيطه.

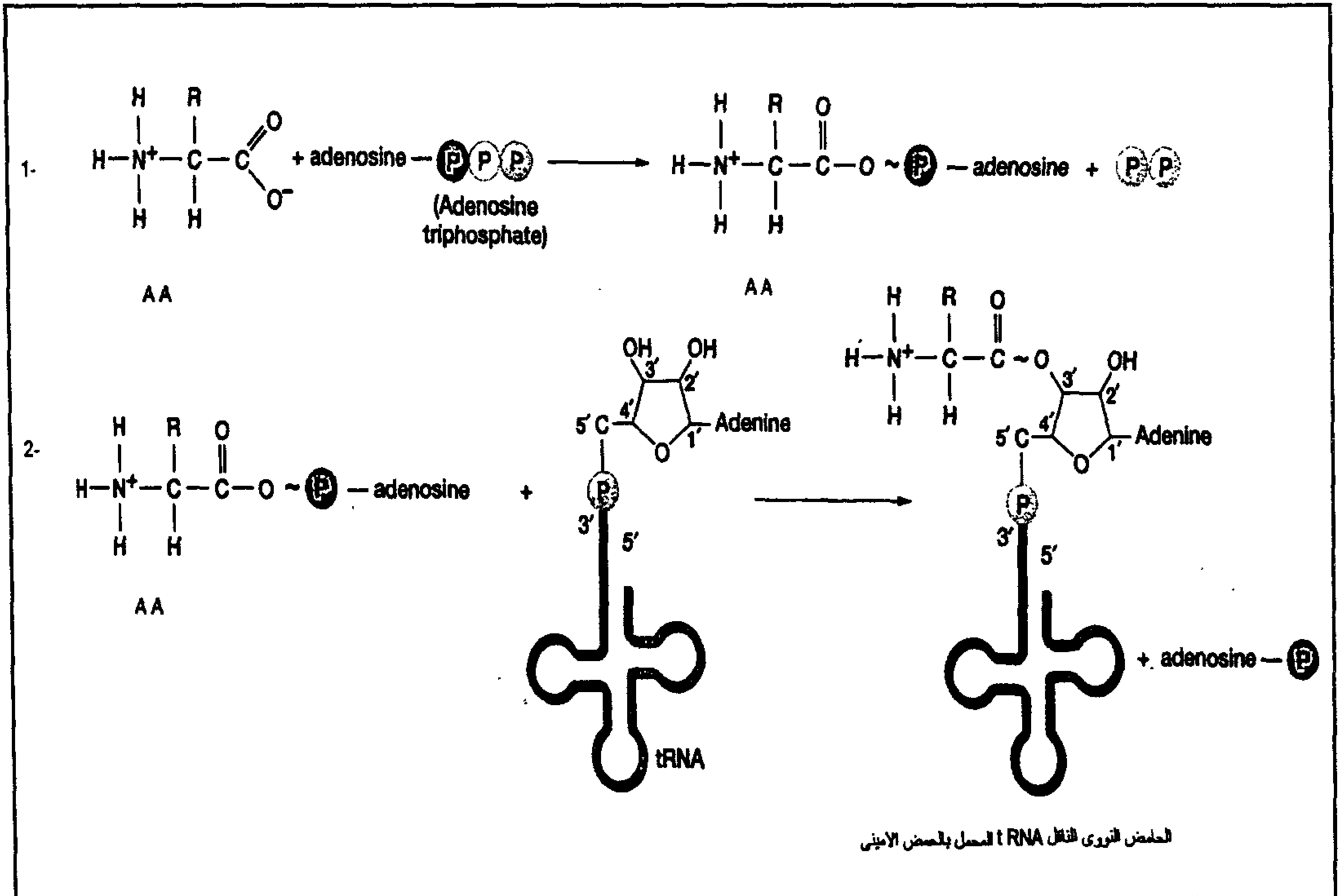
ب- الحامض النووى الناقل tRNA والذي يقوم بنقل الحامض الأميني ووضعه فى مكانه الصحيح من السلسلة عديدة الببتيد بواسطة الريبوسومات الخلوية وذلك لأحتواء كل إنزيم من هذه الإنزيمات (AATS) على موقعين للتعرف أحدهما للتعرف على الحامض الأميني والآخر للتعرف على الحامض النووى الناقل tRNA.

ج- نقل الحامض الأميني المنشط إلى الحامض النووى الناقل tRNA المناسب، حيث يقوم نفس الإنزيم الذي استخدم فى الخطوة السابقة فى المساعدة على نقل الحامض الأميني المنشط إلى الحامض النووى الناقل tRNA المناسب من خلال تعرفه على الـ tRNA حيث يرتبط الحامض الأميني بالـ tRNA عن طريق رابطة اساييل (Acyl bond) بين مجموعة الهيدروكسيل (3'-OH) فى السكر الموجود بنيوكليوتيده الأدينين (A) الطرفية فى الـ tRNA وبين مجموعة الكربوكسيل الموجودة بالحامض الأميني ويترحر الأدينوزين أحادى الفوسفات (AMP) على النحو التالى:



٢- جميع الأحماض الأمينية فى البروتين المناسب: وهى الخطوة الثانية فى التخليق الحيوي للبروتين ويقوم بها الريبوسومات الخلوية، ويتركب الريبوسوم الكامل (70S) فى الكائنات غير حقيقية النواة من وحدتين ريبوسوميتين هما 30S و 50S بينما يتركب الريبوسوم الكامل (80S)

في الكائنات حقيقية النواة من وحدتين ريبوسوميتين هما 40S و 60S وتحتوي الوحدة الريبوسومية 60S وكذلك الوحدة الريبوسومية 50S على موقعين أحدهما يسمى (A site) Amino acyl site والآخر يسمى (P site) Peptidyl site وتبدأ عملية ترجمة mRNA بارتباط الريبوسوم (Ribosome) بخيط mRNA وترجمته إلى البروتين المناسب كما سيأتي ذكره بالتفصيل في الباب الرابع.



شكل (٢٧): يوضح خطوات حمل الحامض النوى الناقل tRNA للحامض الأميني

١- تنشيط الحامض الأميني بالطاقة اللازمة من المركب الغني بالطاقة ATP بواسطة إنزيم Amino acyl tRNA synthetase.

٢- نقل الحامض الأميني المنشط Amino acyladenylic acid إلى الحامض النوى الناقل tRNA بواسطة نفس الإنزيم.

الباب الرابع

الطبيعة الكيميائية للتعبير الجيني

Chemical Nature of Gene Expression

يحدث التعبير الجيني للجينات على مرحلتين على الرغم من أن التعبير الجيني عملية ديناميكية ومستمرة على النحو التالي:

أولاً: النسخ Transcription

وهي أول خطوة في التعبير الجيني وتتمثل في تدفق المعلومات من الـ DNA أو نسخ التتابعات النيوكليوتيدية من الـ DNA من خلال عملية البلمرة (Polymerization) التي يقوم بها إنزيم البلمرة (RNA polymerase) وتكوين خيط الـ RNA الرسول (mRNA) الذي يحمل التتابعات النيوكليوتيدية المكمل لتلك الموجودة في الـ DNA مع إحلال سكر الريبوز في الـ RNA وكذلك القاعده يوراسيل (U) بدلاً من الثيمين (T) حيث يستخدم هذا الإنزيم الخيط القالب من الـ DNA الذي إتجاهه 3' ← 5' كقالب لتكوين خيط الـ mRNA (شكل ٢٨).
وتتلخص الخصائص الكيميائية العامة للنسخ الإنزيمي للـ DNA فيما يلي:

١- الوحدات البنائية اللازمة لتخليق خيط الـ mRNA وهي

أ- الأدينوزين ثلاثي الفوسفات (Adenosine triphosphate (ATP)

ب- الجوانوزين ثلاثي الفوسفات (Guanosine triphosphate (GTP)

ج- اليوريدين ثلاثي الفوسفات (Uridine triphosphate (UTP)

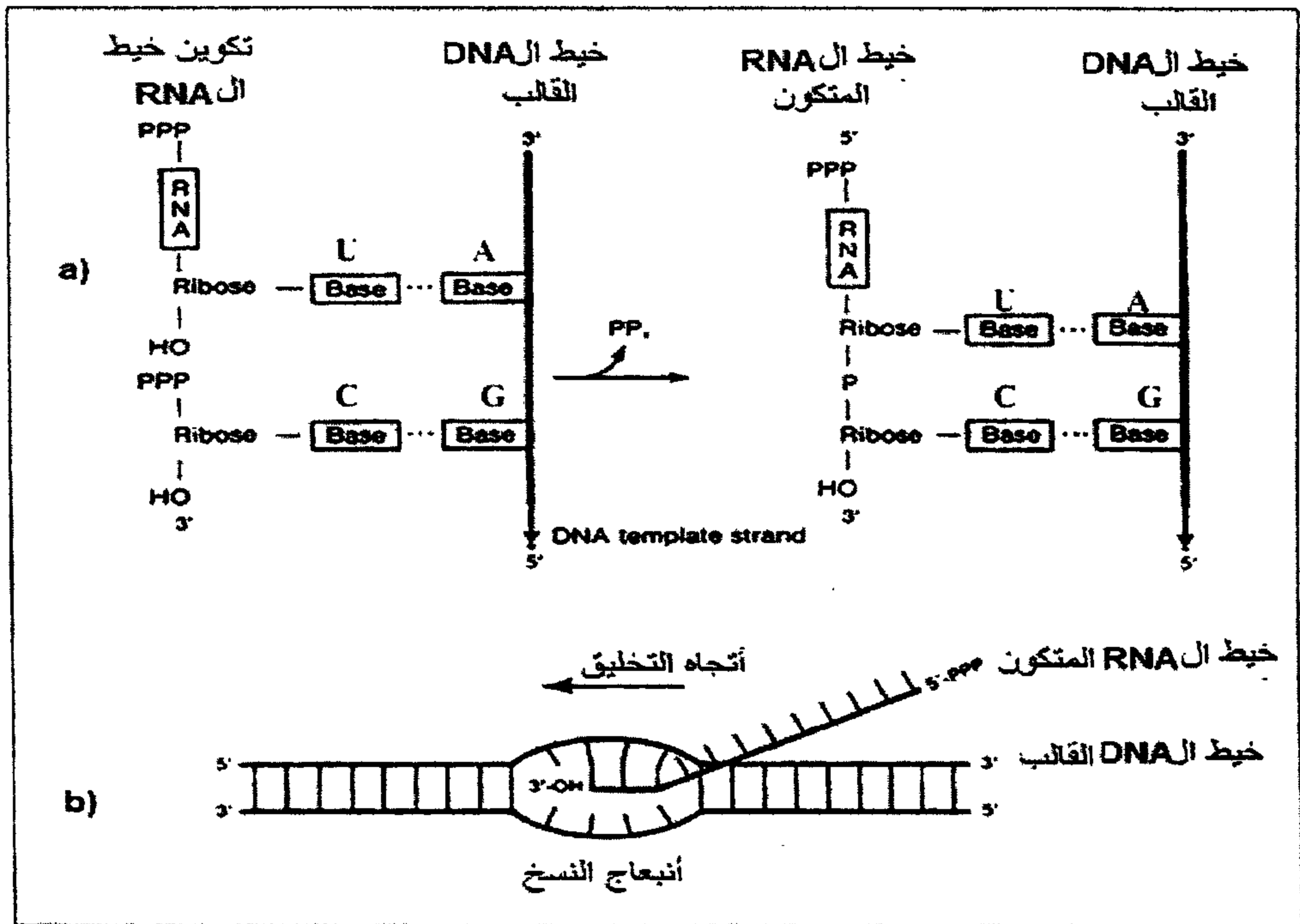
د- السيتوسين ثلاثي الفوسفات (Cytosine triphosphate (CTP)

والتي تحتوى كل وحده من هذه الوحدات البنائية على سكر الريبوز (Ribose)

٢- يبدأ تكوين خيط الـ mRNA بارتباط مجموعة الهيدروكسيل (OH - 3') بالنيوكليوتيدة الأولى مع مجموعة الفوسفات (p - 5') في النيوكليوتيدة الثانية ويحدث إزالة لمجموعة الفوسفات الطرفية في

صورة فوسفات غير عضوية (ppi) ونتيجة لذلك تتكون الرابطة الفوسفودايستر (Phosphodiester) بين النيوكليوتيدتين (شكل ٢٨).

٣- تتابع النيوكليوتيدات فى خيط الـ mRNA يكون مكمل لتتابع النيوكليوتيدات الموجوده على خيط الـ DNA القالب الذى إتجاهه $3' \leftarrow 5'$ وذلك من خلال الاقتران بين النيوكليوتيدات المكمله حيث يقترن كل من اليوراسيل (U) والسيتوسين (C) فى خيط الـ mRNA المتكون بكل من الأدينين (A) والجوانين (G) فى خيط الـ DNA القالب وكذلك يقترن الأدينين (A) والجوانين (G) فى خيط الـ mRNA المتكون بكل من الثيمين (T) والسيتوسين (C) فى خيط الـ DNA القالب.



شكل (٢٨) : تخليق الـ RNA (RNA synthesis)

a- خطوة البلمرة (Polymerization Step).

b- خيط الـ RNA الناتج ينسخ فى الإتجاه $5' \leftarrow 3'$ فقط من على الخيط القالب وبذلك يحتوى الطرف $3'$ على مجموعة هيدروكسيل $3'-OH$ بينما يحتوى الطرف $5'$ على ثلاثة مجاميع فوسفات ($5'-ppp$).

٤- يتم إضافة النيوكليوتيدات الى الطرف OH - 3' فقط في خيط الـ mRNA النامي وبذلك سوف يحتوى الطرف 5' من الـ RNA الذى انتهى تخليقه على ثلاثة مجاميع فوسفات (ppp - 5') ولذلك يسمى إتجاه تخليق خيط الـ mRNA بالإتجاه 5' ← 3' والذى يكون فى إتجاه معاكس لخيط الـ DNA القالب والذى إتجاهه 3' ← 5'.

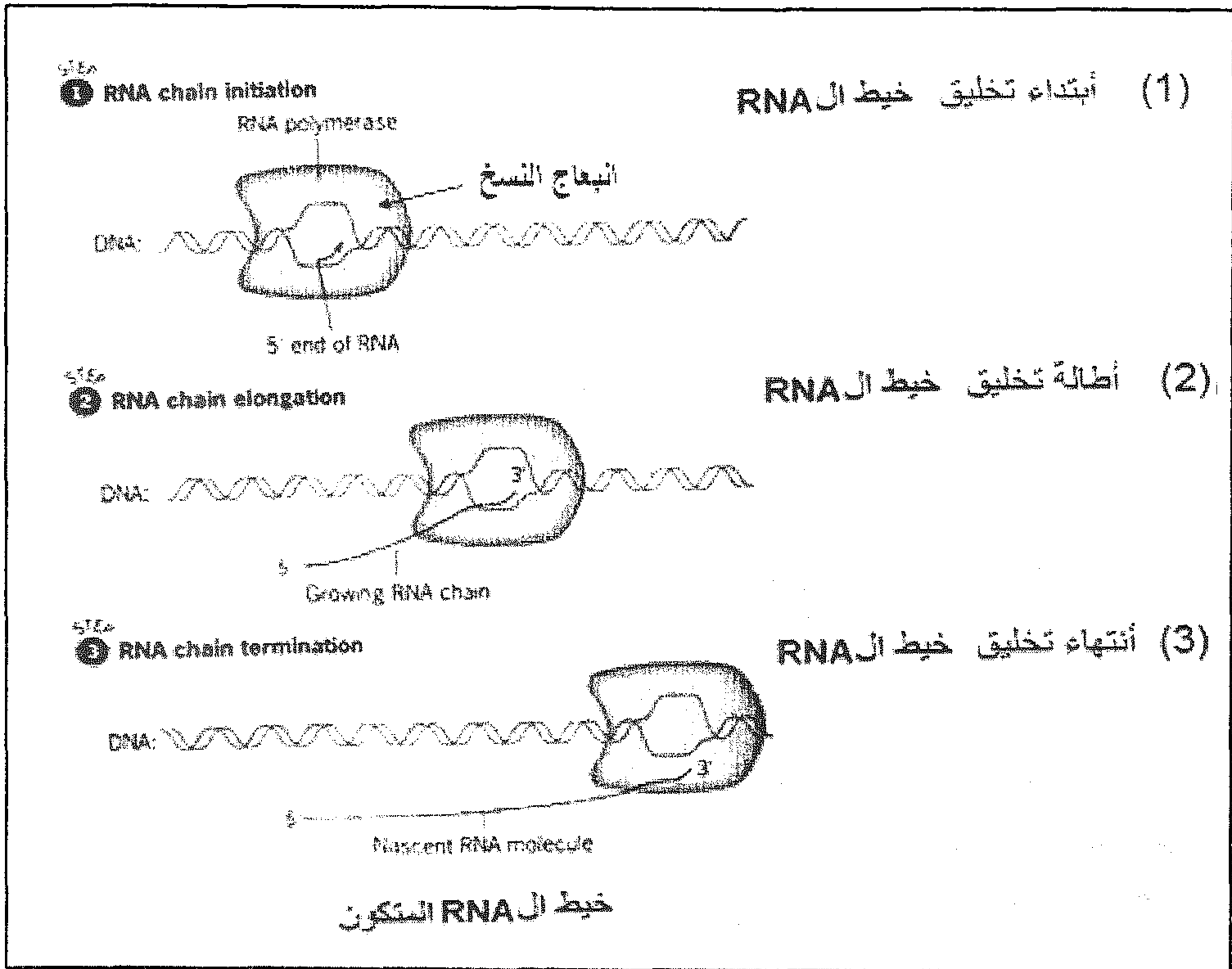
وعلى الرغم من أن عملية تخليق خيط الـ mRNA أو نسخ الخيط القالب عملية ديناميكية ومستمرة إلا أنها تحدث من خلال ثلاثة مراحل على النحو التالى (شكل ٢٩) :

أ- مرحلة البداية (Initiation stage)

وفى هذه المرحلة يتعرف إنزيم البلمرة RNA polymerase على منطقة البروموتور (Promoter) عن طريق الوحدة البروتينية سجما (δ) حيث يرتبط الإنزيم الكامل (Holoenzyme) بالبروموتور ويساعد هذا الارتباط فى انفصال خيطى الـ DNA عن بعضها وتكوين انبعاث النسخ (Transcription bubble) ثم تتفصل الوحدة سجما (δ) عن باقى الإنزيم المركزى (Core enzyme) والذى يقوم بنسخ الخيط القالب حيث يقوم الإنزيم الخام بوضع أول نيوكليوتيدة فى خيط الـ mRNA النامى فى الإتجاه 5' → 3'.

ب- مرحلة الإطالة (Elongation stage)

وفى هذه المرحلة يبدأ تحرك الإنزيم المركزى داخل انبعاث النسخ على طول الخيط القالب مضيفاً النيوكليوتيدات تلون الأخرى الى الطرف OH - 3' من خيط الـ mRNA النامى بمعدل ٢٠٠ نيوكليوتيدة فى الثانية الواحدة عن طريق الاقتران بين القواعد المكملة فى كل من الخيط القالب وخيط الـ mRNA النامى وتكوين الروابط الفوسفودايستر بين هذه النيوكليوتيدات ويستمر الإنزيم المركزى فى الحركة داخل انبعاث النسخ على طول الخيط القالب مضيفاً النيوكليوتيدات الى الطرف OH - 3' من خيط الـ mRNA النامى حتى يصل الى منطقة إنتهاء النسخ فى الخيط القالب حيث يتوقف عن الاستمرار فى النسخ وإطالة خيط الـ mRNA النامى. ويلاحظ أنه كلما تقدم الإنزيم المركزى داخل انبعاث النسخ يتكون الحلزون المزدوج (Double helix) مرة أخرى بين خيطى الـ DNA فى الجزء الذى تم نسخه.



شكل (٢٩): يوضح مراحل النسخ (Transcriptional Stages) بواسطة إنزيم البلمرة RNA polymerase

1-مرحلة البداية (Initiation) ٢-مرحلة الإطالة (Elongation) ٣-مرحلة الإنتهاء (Termination)

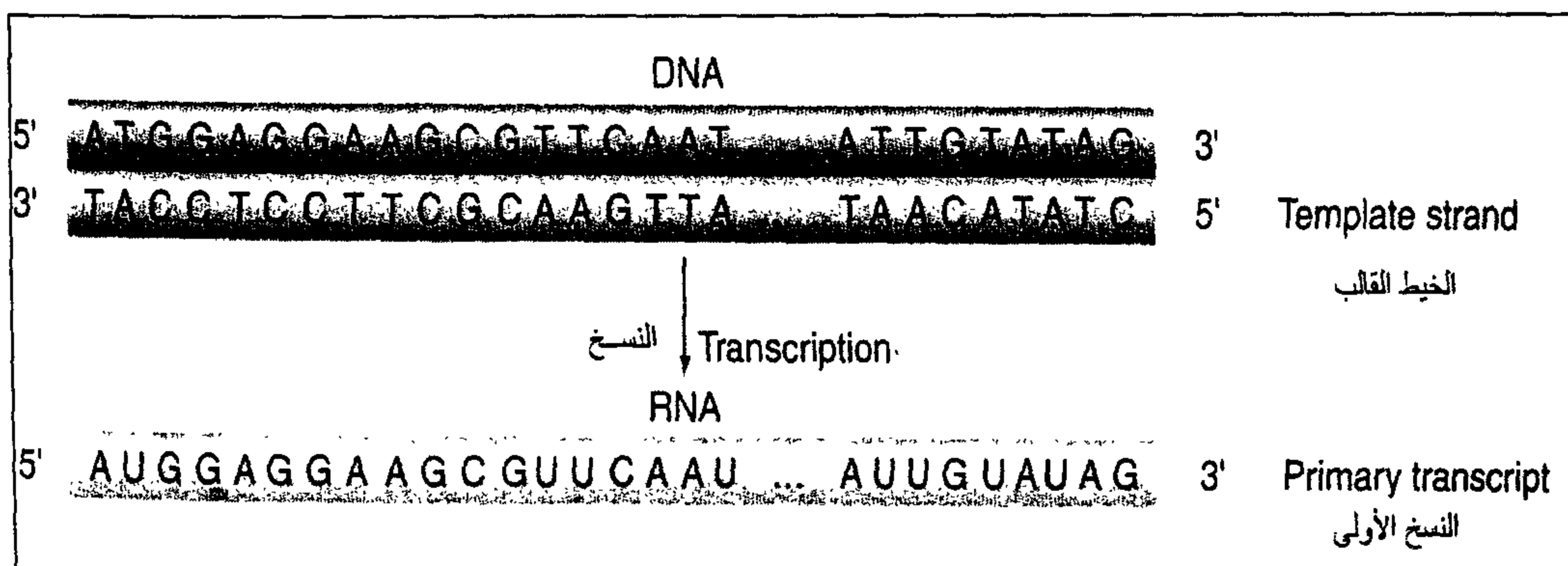
ج- مرحلة الإنتهاء (Termination stage)

وفى هذه المرحلة يتوقف الإنزيم المركزى عن الاستمرار فى الحركة داخل انبعاج النسخ ويتوقف عن إضافة النيوكليوتيدات الى الطرف 3'-OH من خيط الـ mRNA النامى وبذلك تكون قد أنتهت عملية النسخ وتكوين خيط الـ mRNA كامل التكوين وعند ذلك يترك الإنزيم المركزى وكذلك خيط الـ mRNA الكامل التكوين خيط الـ DNA القالب بمساعدة بعض العوامل البروتينية الموجودة بالنواة.

ثم بعد ذلك يترك خيط الـ mRNA النواة (Nucleus) ويذهب الى السيتوبلازم من خلال الثقوب الموجودة في الغلاف النووي لترجمته الى البروتين المناسب. ويلاحظ أنه بانتهاء النسخ يكون قد تم تدفق ونقل المعلومات الوراثية (التتابعات النيوكليوتيدية) الموجودة في الخيط القالب في صورة تتابعات نيوكليوتيدية محددة في خيط الـ mRNA يحددها ويمليها تلك التتابعات النيوكليوتيدية الموجودة في الخيط القالب (شكل ٣٠).

ثانياً: الترجمة (Translation)

يمكن تقسيم مراحل ترجمة الرسالة الوراثية (mRNA) الى ثلاثة مراحل وبالأخذ في الاعتبار أن الترجمة عملية ديناميكية (Dynamic) ومستمرة فإنه يوجد عدد من العوامل البروتينية والتي لكل عامل منها دور في عملية الترجمة (جدول ٤)



شكل (٣٠) : تدفق المعلومات من الجين خلال عملية نسخه وتكوين الـ RNA.

يتمثل تدفق المعلومات في طبع التتابع النيوكليوتيدي الموجود في الخيط القالب الذي إتجاهه 3' ← 5' إلى ذلك التتابع النيوكليوتيدي المكمل في المنسخ الأولي (Primary transcript) مع إحلال اليوراسيل (u) محل الثيمين (T) في خيط المنسخ الأولي الذي يتم نسخه في الإتجاه 5' ← 3'.

جدول (٤): يوضح العوامل البروتينية (Protein Factors) التى لا دور فى عملية الترجمة فى البكتيريا *E. coli*

الدور (Role)	العامل (Factor)	العملية (Process)
يثبت الوحدة الريبوسومية الصغيرة (30S). يربط الـ fmet- RNA بالوحدة الريبوسومية الصغيرة (30S) والمرتبطة بالـ mRNA. يربط الوحدة الريبوسومية الصغيرة بالـ mRNA وكذلك انفصال الوحدات الريبوسومية عن بعضها بعد انتهاء الترجمة.	IF ₁ ← IF ₂ ← IF ₃ ←	بداية الترجمة (Initiation of Translation)
يرتبط بالـ GTP وإحضار الـ amino acyl – tRNA إلى الموقع A من الريبوسوم. يولد العامل EF- T ₄ النشط. يحفز عملية الانتقال GTP – dependent.	EF- T ₄ ← EF- T ₅ ← EF- G ←	إطالة السلسلة عديدة الببتيد (Elongation of polypeptide chain)
يحفز تحرر السلسلة عديدة الببتيد من الـ tRNA وانتقال مكونات الانتقال عند شفرات الانتهاء UAA و UAG. يسلك نفس سلوك RF ₁ وخاصة بالنسبة لشفرات الانتهاء UAA و UAG. ينبه كل من العامل RF ₁ و RF ₂ .	RF ₁ ← RF ₂ ← RF ₃ ←	إنهاء الترجمة وتحرر السلسلة عديدة الببتيد (Termination of translation and release of polypeptide chain)

وسوف نتناول مراحل الترجمة على النحو التالي:

أ- مرحلة البداية (Initiation stage)

تشمل مرحلة بداية الترجمة في الكائنات غير حقيقية النواة مثل البكتيريا على المكونات التالية (شكل ٣١) :

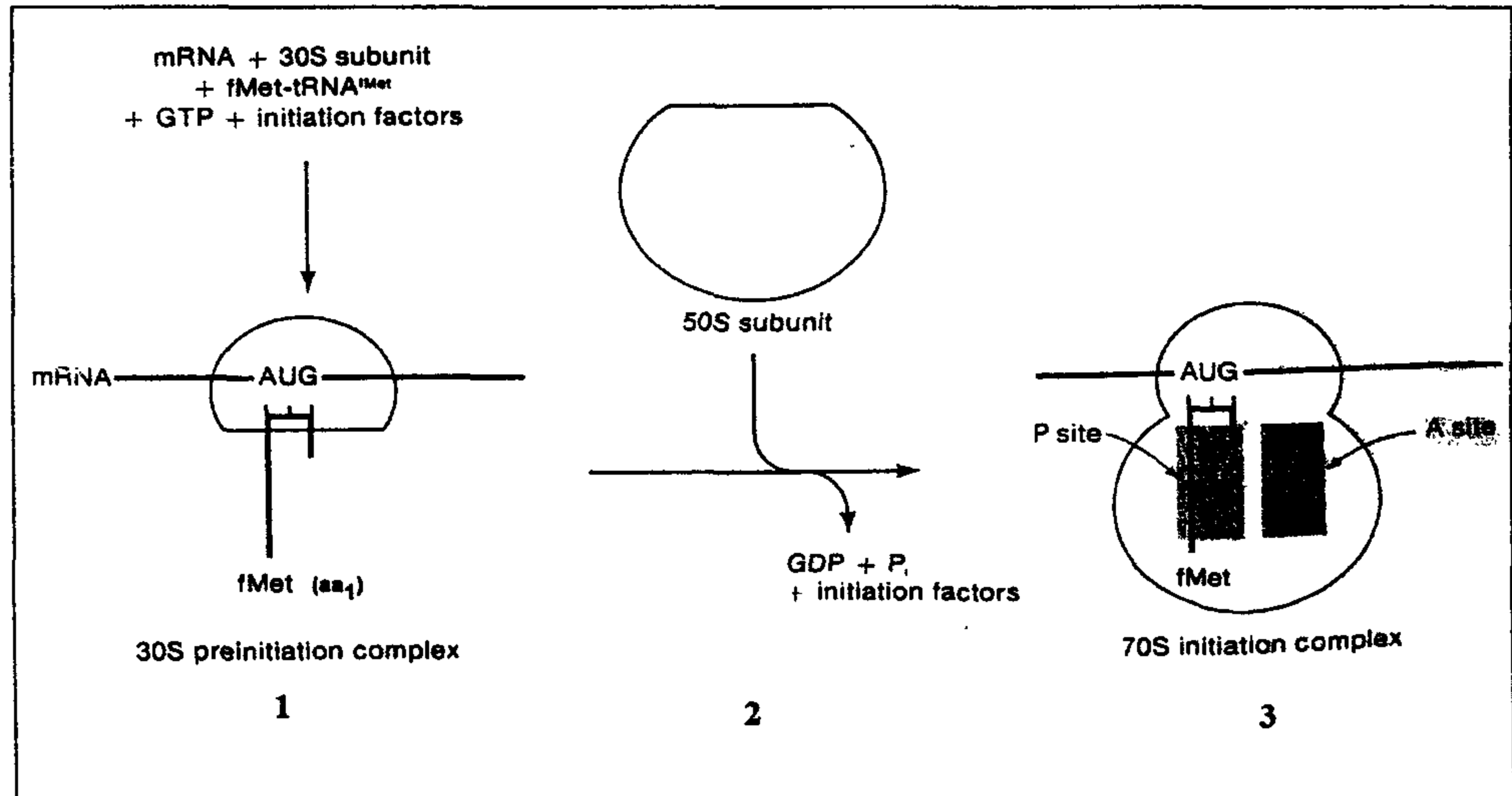
- ١- الوحدة الريبوسومية الصغيرة (30 S) .
- ٢- جزيء mRNA .
- ٣- الحامض النووي الناقل الأول الذى يحمل الحامض الأميني فورمايل ميثيونين (Formyl methionine) وهو fmet - tRNA .
- ٤- المركب الغنى بالطاقة GTP .
- ٥- عدد من العوامل بداية الترجمة (Initiation factors (IFs) والتي تعتبر من المكونات الأساسية للوحدة الريبوسومية الصغيرة (30S) وتتفصل هذه العوامل (IFs) عن الريبوسوم بمجرد ابتداء الترجمة وتتلخص خطوات بداية الترجمة فيما يلى:
- ١- تستدعى شفرة البداية AUG الموجوده فى mRNA الـ tRNA الذى يحمل الحامض الأميني فورمايل ميثيونين (fmet-tRNA).
- ٢- ترتبط الوحدة الريبوسومية الصغيرة (30S) بعدد من عوامل البداية (IFs) والموضحة فى (جدول ٤) ودور كل منها.
- ٣- ارتباط الوحدة الريبوسومية الصغيرة (30S) بالمRNA يتضمن تتابع نيوكليوتيدى من ستة نيوكليوتيدات يعرف بالتتابع AGGAGG والذى يسبق شفرة البداية AUG من mRNA ويسمى هذا التتابع النيوكليوتيدى باسم تتابع شاين دالجارنو (Shine-Dalgarno sequence) والذى يمثل القواعد التى تقترن بالطرف 3' من الـ 16SrRNA الموجود فى الوحدة الريبوسومية الصغيرة (30S) مما يسهل من عملية الترجمة كذلك يعزز العامل البروتيني IF2 ارتباط الحامض النووى الناقل fmet-tRNA والمحمل بالحامض الأميني فورمايل ميثيونين بالوحدة الريبوسومية الصغيرة (30S) إستجابة لشفرة البداية AUG. وهذه الخطوة تجعل القالب الشفرى فى mRNA يحدث له ترجمة فى غاية الدقة لكل الشفرات (Codons) وعند هذه اللحظة ترتبط الوحدة الريبوسومية الكبيرة (50S) بالوحدة الريبوسومية الصغيرة (30S) لتكوين

الريبوسوم الكامل (70S) والطاقة التى تحتاجها هذه العملية تؤخذ من المركب الغنى بالطاقة GTP وبعد ذلك يحدث تحرر لكل عوامل بداية الترجمة (IFs) من على الريبوسوم.

ب- مرحلة الإطالة (Elongation stage)

هى الخطوة الثانية من عملية الترجمة حيث أنه بمجرد أن يتكون الريبوسوم الكامل (70S) وارتباطه بالمRNA يتكون موقعين من الريبوسوم هما الموقع P (Peptidyl site) والموقع A (Amino acyl site) وتتلخص خطوات مرحلة الإطالة (Elongation) فى الخطوات التالية:

١- ارتباط أول حامض نووى ناقل tRNA والمحمل بأول حامض أمينى بالموقع P من الريبوسوم عند شفرة البداية AUG من mRNA.



شكل (٣١) : يوضح مراحل بداية الترجمة (Initiation of translation) وهى:

- ١- ارتباط الـ mRNA بالوحدة الريبوسومية الصغيرة بمساعدة عوامل البداية IF₁, IF₂, IF₃.
- ٢- ارتباط الحامض النووى الناقل الذى يحمل الحامض الأمينى فورمايل ميثيونين tRNA f met بالمRNA عند شفرة بداية الترجمة AUG فى الموقع P من الريبوسوم وتحرر عامل البداية IF₃.
- ٣- ارتباط الوحدة البروتينية الكبيرة بالوحدة الصغيرة وتكوين الريبوسوم الكامل (70S) وتحرر كل من عامل البداية IF₁, IF₂, وارتباط عامل الإطالة EF-Tu بالمRNA مسهلاً الطاقة للموقع A من الريبوسوم.

٢- تزداد طول السلسلة عديدة الببتيد في الطول بإضافة الأحماض الأمينية الى السلسلة عديده الببتيد حيث تحدد الشفرة (Codon) الثانية من mRNA دخول tRNA المحمل بالحامض الأميني الثانى فى الموقع A من الريبوسوم (شكل ٣٢) وبمجرد حدوث ذلك يقوم إنزيم Peptidyl transferase بتكوين الرابطة الببتيدية بين الحامض الأميني الأول والثانى ويحفز نشاط هذا الإنزيم الحامض النووى الريبوسومى 23SrRNA الموجود فى الوحدة الريبوسومية الكبيرة (50S) وفى نفس الوقت تنكسر الرابطة بين الحامض الأميني والتRNA الحامل له والموجود فى الموقع P من الريبوسوم ونتيجة لذلك يتصل الحامضين الأمينين بالطرف 3' من tRNA الذى مازال موجوداً بالموقع A من الريبوسوم.

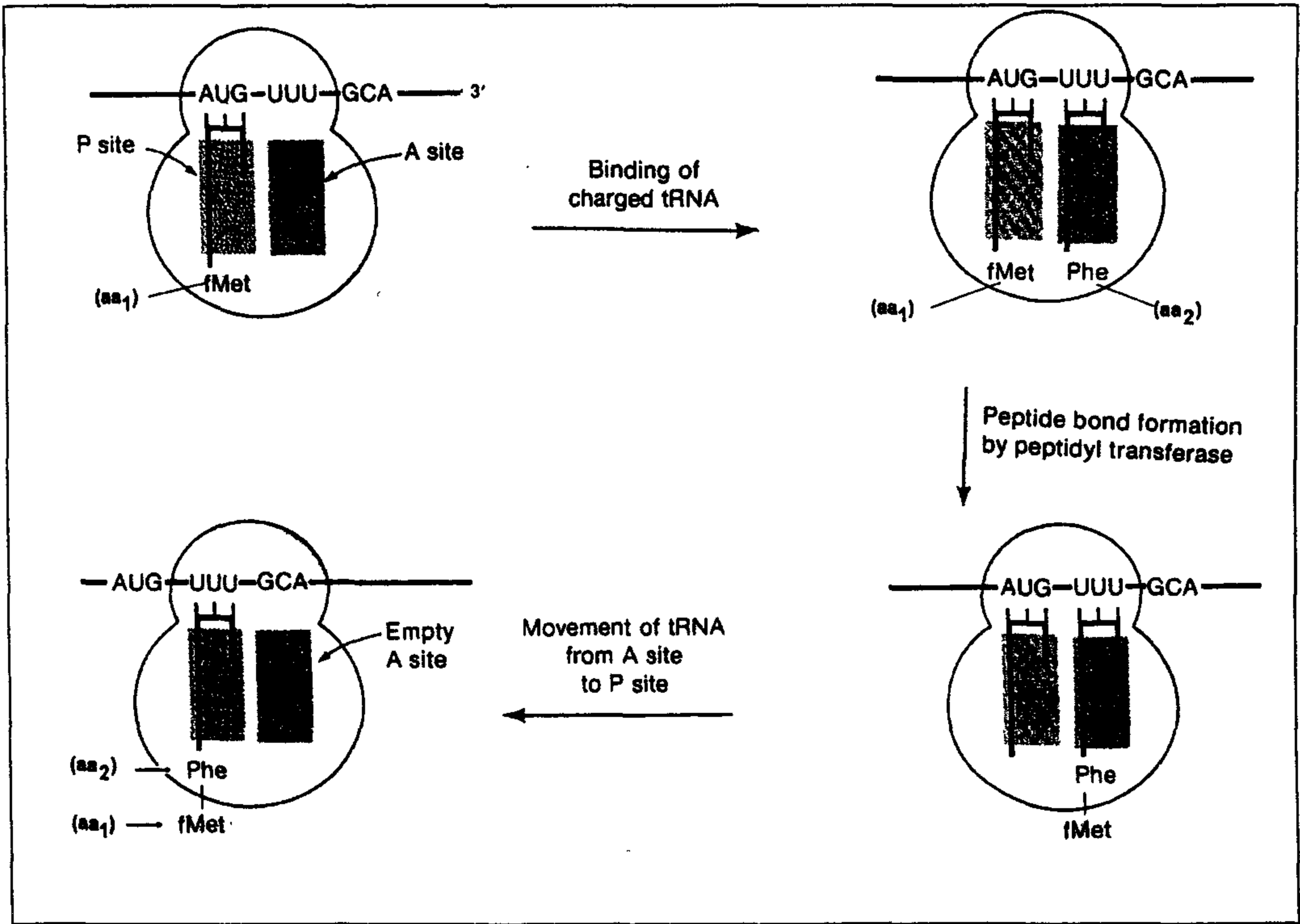
٣- قبل أن تتكرر عملية الإطالة فإن tRNA الموجود بالموقع P يصبح غير محمل باى حامض أميني وبالتالي يجب أن يترك الوحدة الريبوسومية الكبيرة (50S) ولذلك فإنه ينتقل مؤقتاً الى موقع ثالث من الريبوسوم يعرف باسم E site ليترك الريبوسوم بعد ذلك.

٤- ينتقل المركب المكون من mRNA والتRNA الذى يحمل الحامض الاميني الاول aa₁ والثانى aa₂ (mRNA-tRNA-aa₂-aa₁) الى الموقع P بمسافة مقدارها شفرة (Codon) واحده أخرى وتحتاج هذه الخطوة الى عديد من عوامل الإطالة (جدول ٤) وكذلك الطاقة اللازمة لذلك يقدمها المركب الغنى بالطاقة GTP ونتيجة لذلك تصبح الشفرة الثالثة من mRNA فى الموقع P من الريبوسوم الذى سوف يستقبل الحامض النووى الناقل الثالث tRNA والمحمل بالحماض الأميني الثالث وعلى ذلك يلاحظ أنه فى كل حركة للمRNA مقدارها شفرة واحدة فإن الموقع P من الريبوسوم يحتوى على tRNA المحمل بالسلسلة عديدة الببتيد بينما يكون الموقع A محتوياً على tRNA المحمل بالحامض الأميني الجديد.

٥- تتكرر عملية الإطالة التى يحدث فيها إضافة لأحد الأحماض الأمينية للسلسلة عديدة الببتيد فى كل خطوة يتحرك فيها mRNA حركة مقدارها شفرة واحدة خلال الريبوسوم.

٦- بمجرد أن تتكون السلسلة عديدة الببتيد بالطول المناسب يحدث لها غمر لقاعدة الوحدة الريبوسومية الكبيرة (50S) من خلال النفق (Tunnel) الموجود داخل الوحدة الريبوسومية الكبيرة (50S).

٧- دور الوحدة الريبوسومية الصغيرة (30S) أثناء عملية الاطالة هو قراءة الشفرات بينما يكون دور الوحدة الريبوسومية الكبيرة (50S) هو تكوين وتخليق الروابط الببتيدية وهذه العملية تتم بكفاءة عالية والخطأ المشاهد فى هذه العملية هو خطأ واحد لكل ١٠^٤ عملية اطالة بمعنى أنه يحدث ادخال خطأ لحامض أمينى مرة واحدة لكل ٢٠ سلسلة عديدة الببتيد طول كل سلسله منها ٥٠٠ حامض أمينى. وتحدث عملية الإطالة فى البكتيريا *E. coli* تحت درجة حرارة ٣٧ °م بمعدل ادخال ١٥ حامض فى السلسلة عديدة الببتيد فى الثانية الواحدة.



شكل (٣٢) يوضح مراحل الاطالة (Elongation stages)

- ١- دخول ثانى tRNA المحمل بثنائى حامض أمينى aa₂ الموقع A من الريبوسوم وبذلك تبدأ أول خطوة فى الاطالة.
- ٢- تكوين الرابطة الببتيدية وتحرك tRNA الخالى من الحامض الأمينى الى الموقع E من الريبوسوم ثم بعد ذلك الى خارج الريبوسوم ثم يتحرك الـ mRNA تجاه الشمال بمقدار شفرة ثلاثية ويؤدى ذلك الى انتقال الـ tRNA المحمل بالحامض الامينى الاول aa₁ والحامض الامينى الثانى aa₂ الى الموقع P من الريبوسوم.

ج- مرحلة الانتهاء (Termination stage)

هذه المرحلة هي ثالث خطوة في عملية الترجمة حيث ينتهي تخليق البروتين عند شفرة أو أكثر من شفرة من شفرات إنهاء الترجمة الموجودة بالموقع A من الريبوسوم (UAG أو UAA أو UGA) وذلك لأن هذه الشفرات ليست خاصة بأى حامض أميني وبالتالي فإنها لا تستدعي أى حامض نووى ناقل tRNA الى الموقع A من الريبوسوم وهذه الشفرات تسمى شفرات إنهاء الترجمة أو شفرات التوقف أو الشفرات التى ليس لها معنى وعند ذلك فإن السلسلة عديدة الببتيد المتكونة بالكامل تظل متصلة بآخر حامض نووى ناقل tRNA والموجود فى الموقع P من الريبوسوم وبذلك يصبح الموقع A من الريبوسوم شاغراً أو فارغاً. وتنشط عوامل انتهاء الترجمة (GTP-dependent termination) انفصال جميع مكونات عملية الترجمة عن بعضها، وبمجرد أن يحدث هذا الانفصال يترك الـ tRNA الريبوسوم ثم تنفصل مكونات الريبوسوم الكامل (70S) الى الوحدة الريبوسومية 30S و الوحدة الريبوسومية (50S) مرة أخرى. وإذا ظهرت شفرة من شفرات إنهاء الترجمة فى وسط الـ mRNA نتيجة لحدوث طفرة فسوف تحدث نفس الخطوات ولكن تنتج سلسلة عديدة الببتيد غير كاملة التكوين.

عديد الريبوسومات (Polyribosomes)

عندما تتقدم اطالة السلسلة عديدة الببتيد يتحرك الجزء الأول من الـ mRNA خلال الريبوسوم وبالتالي يصبح هذا الطرف من الـ mRNA حر فى ان يرتبط به الوحدة الريبوسومية الصغيره (30S) لتمثل بداية جديدة أخرى لعملية الترجمة وهذه العملية قد تتكرر عديد من المرات على نفس الـ mRNA مكونة ما يعرف بعديد الريبوسومات (Polyribosomes) أو (Polysomes) والتى تم عزلها وتحليلها من خلال المعاملة الهادئة والدقيقة للخلايا. وتكوين عديد الريبوسومات يمثل كفاءة استخدام مكونات الترجمة المتاحة لتخليق البروتين فى وحدة الزمن ولكنه عند أى وقت ما أثناء التخليق الحيوى للبروتين يتكون عديد من السلاسل عديدة الببتيد ذات الأطوال المختلفة. وعلى الرغم من أن آلية التعبير الجيني هي نفس الآلية فى كل من الكائنات

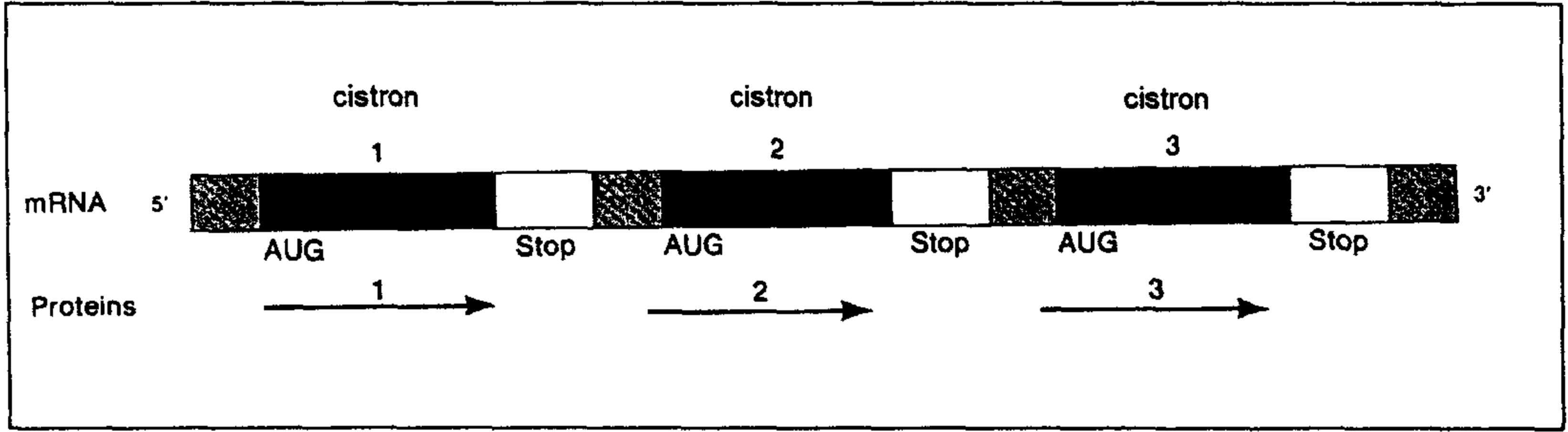
حقيقية النواة والكائنات غير حقيقية النواة إلا أنه توجد بعض الاختلافات الجوهرية في عملية الترجمة نوجزها فيما يلي:

١- في الكائنات غير حقيقية النواة تبدأ عملية الترجمة وتخليق السلسلة عديدة الببتيد بالحامض الأميني فورمايل ميثيونين والذي يحمله الحامض النووي الناقل (fmet-tRNA) تمييزاً له عن الحامض النووي الذي يحمل الحامض الأميني ميثيونين Methinine (met tRNA) وكلاهما يتعرف على شفرة البداية AUG وعندما توجد هذه الشفرة AUG في بداية الرسالة mRNA فإنه يتم وضع الحامض الأميني فورمايل ميثيونين بواسطة الـ fmet-tRNA ولكن إذا وجدت هذه الشفرة (AUG) داخل الرسالة الوراثية (mRNA) فإنه يتم وضع الحامض الأميني ميثيونين بواسطة الـ met-tRNA ، بينما في الكائنات حقيقية النواة تبدأ الترجمة بالحامض الأميني ميثيونين الذي يحمله الحامض النووي الناقل met-tRNA .

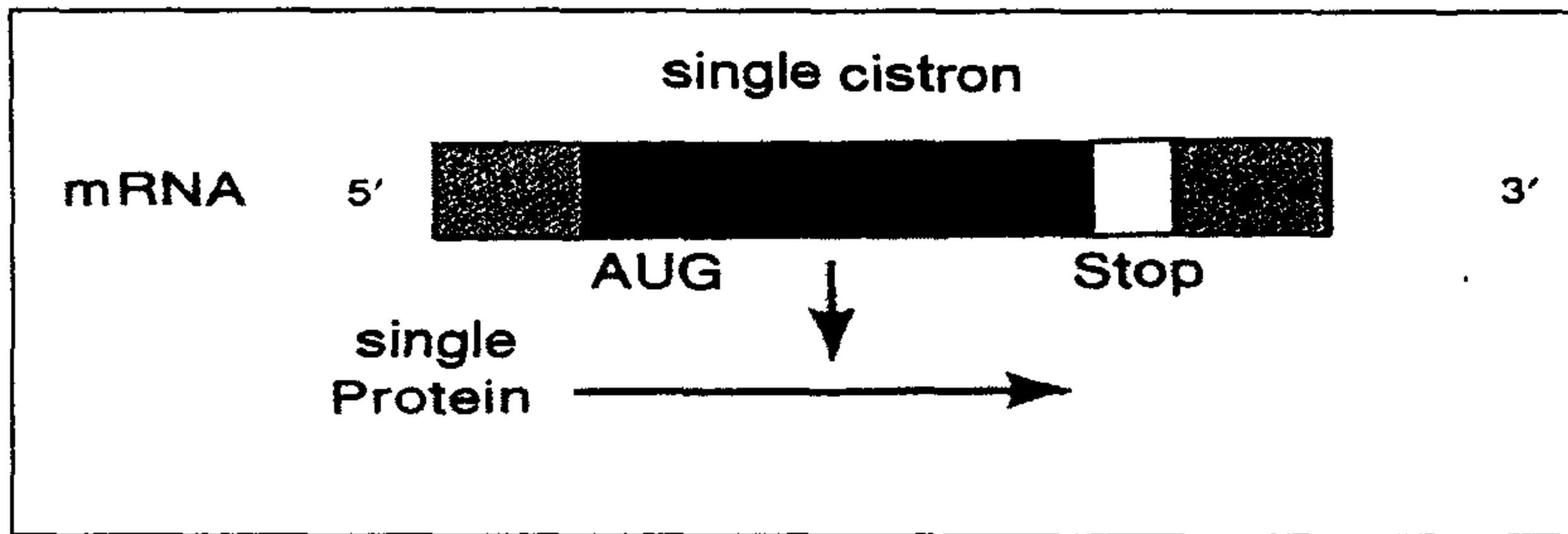
٢- يبدأ تخليق السلسلة عديدة الببتيد في الكائنات غير حقيقية النواة بارتباط الوحدة الريبوسومية الصغيرة (30S) بالـ mRNA عند شفرة البداية كما سبق ذكره وليس بارتباط الريبوسوم الكامل (70S) بينما في الكائنات حقيقية النواة يرتبط الريبوسوم الكامل (80S) بالطرف 5' من الـ mRNA ثم يتحرك على طول الـ mRNA حتى يصل الى شفرة البداية AUG والقريبة جداً من الطرف 5' من الـ mRNA.

٣- في الكائنات غير حقيقية النواة يحمل الـ mRNA الشفرات اللازمة للتعبير عن عدد من أنواع السلاسل عديدة الببتيد المختلفة ولذلك يسمى باسم الـ mRNA المتعدد السسترونات (Polycistronic mRNA) وذلك خلال نسخه لمجموعة من الجينات (السسترونات) المتجاورة والتي تعطى أنواع مختلفة من السلاسل عديدة الببتيد وعلى ذلك فإن هذا الـ mRNA المتعدد السسترونات يجب أن يحتوى على عدد من شفرات البداية (AUG) وعدد من شفرات إنهاء الترجمة (شكل ٣٣) بينما في الكائنات حقيقية النواة يحمل الـ mRNA الناضج (Mature mRNA) الشفرات اللازمة لتخليق نوع واحد من السلاسل عديدة الببتيد وبذلك يسمى بالـ mRNA أحادي السسترون (Monocistronic mRNA) وعلى ذلك فإنه سوف يحتوى على شفرة بداية AUG واحده وشفرة إنهاء الترجمة واحده (شكل ٣٤).

١- في الكائنات غير حقيقية النواة لا توجد نواة (Nucleus) بالخلية وبذلك تحدث كل من عملية النسخ وعملية الترجمة في نفس الجزء من السيتوبلازم وبذلك فإنه غالباً في نفس الوقت الذي يحدث فيه نسخ الخيط القالب وتكوين خيط الـ mRNA يحدث له ترجمة بواسطة الريبوسومات وقبل أن ينتهي نسخ الـ mRNA بالكامل. بينما في الكائنات حقيقية النواة تحدث عملية النسخ داخل النواة بينما تحدث عملية الترجمة بالسيتوبلازم وبالتالي لا يحدث تداخل بينهما.



شكل (٣٣): يوضح جزئ الـ mRNA في الكائنات غير حقيقية النواة والذي يحمل الشفرات اللازمة لإنتاج عديد من أنواع البروتينات polycistronic mRNA وبالتالي فإنه يحتوى على عديد من شفرات بداية الترجمة AUG وعديد من شفرات إنهاء الترجمة (Stop codon) لإنتاج الأنواع المختلفة من البروتينات عند ترجمته بريبوسومات الكائنات غير حقيقية النواة.



شكل (٣٤): يوضح جزئ الـ mRNA الناضج في الكائنات حقيقية النواة والذي يحمل الشفرات (Codons) اللازمة لتخليق نوع واحد من البروتينات ويسمى بالـ monocistronic mRNA حيث يحتوى على شفرة واحدة لبداية الترجمة AUG وشفرة واحدة لتوقف الترجمة (Stop codon) وذلك من خلال ترجمته بريبوسومات الكائنات حقيقية النواة.

الباب الخامس

تنظيم التعبير الجيني في الكائنات غير حقيقية النواة

Regulation of Gene Expression In Prokaryotes

مما سبق أصبح من المؤكد معرفة كيفية تواجد الجينات في الـ DNA والكيفية التي تخزن بها الجينات المعلومات الوراثية فضلاً عن الكيفية التي يتم بها التعبير الجيني لهذه الجينات وفيما يلي سوف نتناول أكثر الأساسيات جدلاً في الوراثة الجزيئية (Molecular genetics) وهي كيفية تنظيم التعبير الجيني ، ومع ذلك فإن فكرة أن الجينات يمكنها أن تعمل (Turned on) أو تتوقف عن العمل (Turned off) هي أكثر اقناعاً. ولقد أوضح التحليل التفصيلي للبروتينات في البكتيريا *E. coli* على سبيل المثال اختلاف تركيزات ٤٠٠٠ نوع أو أكثر من السلاسل عديدة الببتيد والتي توجد شفراتها على الجينات اختلافاً كبيراً. فبعض البروتينات قد توجد في صورة عدد قليل من الجزيئات فيما بين ٥ إلى ١٠ جزيئات بروتينية للخلية الواحدة بينما بعض البروتينات الأخرى مثل البروتينات الريبوسومية وكثير من البروتينات التي لها دور في الممرات الحيوية توجد بكميات ضخمة وكبيرة تصل إلى ١٠٠ ألف نسخة من كل بروتين من هذه البروتينات لكل خلية. وعلى ذلك فإن معظم نواتج الجينات في الكائنات غير حقيقية النواة تتواجد بصورة مستمرة عند مستوى أساسي (Basal level) في صورة عدد قليل من النسخ البروتينية وأن هذا المستوى من التركيز يتزايد بصورة مفاجئة. ومن ثم يبدو واضحاً أنه يجب أن تتواجد آليات أساسية للتحكم في التعبير الجيني. وفي هذا الباب سوف نلقى الضوء على ما نعرفه حول تنظيم التعبير الجيني في البكتيريا.

وتعتبر البكتيريا من الكائنات الممتازة فى الدراسات البحثية المتعددة فى مجال الوراثة الجزيئية بصفة خاصة وفى مجال الوراثة بصفة عامة وذلك للأسباب الآتية:

١- أن دورة تكاثرها قصيرة.

٢- أنها تتكاثر لمئات من الأجيال منتجاً ملايين من الخلايا البكتيرية المتماثلة والمتطابقة وراثياً خلال ليلة من نموها وتكاثرها على البيئة الغذائية.

٣- سهولة استحداث الطفرات وعزلها الناتجة من خلية بكتيرية مفردة ودراستها بصورة مستقلة. وبالعودة إلى موضوعنا الحالى فإن البكتيريا أيضاً تعتبر نظام نموذجى ممتاز بالنسبة للدراسات التى تتضمن أستحثاث أو تحفيز (Induction) النسخ الوراثةى بالإستجابة للتغير فى الظروف البيئية. وسوف نركز اهتمامنا على تنظيم التعبير الجينى عند مستوى نسخ الجين ويجب أن نضع فى اعتبارنا أيضاً أنه يحدث تنظيم للتعبير الجينى ما بعد عملية نسخ الجين (Posttranscriptional regulation).

الآليات الوراثية فى الكائنات غير حقيقية النواة استجابة للظروف البيئية

Genetic mechanisms to respond to environmental condition in prokaryotes

تم دراسة تنظيم التعبير الجينى بصورة مكثفة فى الكائنات غير حقيقية النواة وخاصة البكتيريا *E. coli*. ومن المعروف وجود آليات وراثية ذات كفاءة عالية تتضمن أن تجعل الجينات تعمل أو تتوقف عن العمل معتمداً ذلك على إحتياجات الخلية الميتابولزمية لنواتج جين معين. وهذا التنظيم فى التعبير الجينى لا يجعل البكتيريا تستجيب إلى التغيرات فى الظروف البيئية فقط ولكنه يمتد أيضاً إلى تنظيم تضاعف وإصلاح (Repair) الـ DNA وكذلك الانقسام الخلوى والنمو فى البكتيريا.

وفكرة ان الكائنات الدقيقة (Microorganisms) تنظم تعبيرها الجيني ليست فكرة جديدة، ففي بداية القرن العشرين لوحظ أنه عندما يوجد سكر اللاكتوز (Lactose) (سكر ثنائى يتركب من الجلوكوز والجالكتوز) فى البيئة الغذائية للبكتيريا فإنها تقوم بإنتاج الإنزيمات اللازمة لميتابولزم سكر اللاكتوز وعند غياب هذا السكر من البيئة لا يحدث إنتاج لهذه الإنزيمات. وبعد ذلك وسريعاً استطاع الباحثين استنباط فكرة تأقلم البكتيريا للظروف البيئية من خلال إنتاجها لإنزيمات معينة فقط عند تواجد مادة تفاعلها فى البيئة ومثل هذه الإنزيمات سميت باسم الإنزيمات المتأقلمة (Adaptive enzymes). وعلى العكس من ذلك فإن الإنزيمات التى تنتج بصورة مستمرة بغض النظر عن وجود مادة تفاعلها فى البيئة الغذائية سميت الإنزيمات التى تنتج بصورة مستمرة (Constitutive enzymes). ومنذ ذلك الحين يستخدم اصطلاح الإنزيمات المحثه أو المحفزه (Inducible enzymes) بصورة أكثر دقة عن اصطلاح الإنزيمات المتأقلمة والذى يعكس دور المحفز (Inducer) فى إنتاج الإنزيمات ولقد أوضحت الأبحاث الحديثة أيضاً وجود نظام عكس النظام السابق حيث أن وجود جزيء معين يكبت التعبير الجيني وهذا عادة ما يكون حقيقى بالنسبة للجزيئات التى تمثل الناتج النهائى لممر تخليقى حيوى فعلى سبيل المثال فان الحامض الامينى التربتوفان (Tryptophan) يمكن تخليقه بواسطة الخلايا البكتيرية وإذا وجدت كميات كافية منه فى البيئة الغذائية يصبح إهدار لطاقة الخلية البكتيرية فى إنتاج الإنزيمات الضرورية لتخليق هذا الحامض الامينى. ولذلك وضعت آلية أو ميكانيزم يكون للتربتوفان دور فى كبت (Repressing) نسخ mRNA الضرورى لإنتاج الإنزيمات المناسبة للممر التخليقى الحيوى وعلى العكس من النظام التحفيزى (Inducible system) الذى يتحكم فى ميتابولزم سكر اللاكتوز فان النظام الذى يتحكم فى إنتاج التربتوفان يسمى بالنظام الكبتى (Repressible system).

وتنظيم التعبير الجيني سواء فى النظام التحفيزى أو الكبتى إما أن يكون تحكم موجب أو تحكم سالب. وفى التحكم السالب يحدث التعبير الجيني ما لم يحدث له غلق (Shut off) بواسطة جزيء منظم (Regulator molecule). وعلى العكس من ذلك فان التحكم الموجب يجب أن يحدث التعبير الجيني أو تحدث عملية النسخ فقط إذا قام الجزيء المنظم مباشرة بتنبيه إنتاج

المRNA . ومن الناحية النظرية فإن كلا الطرازين من التحكم الموجب والسالب يتم بواسطة النظام التحفيزى أو النظام الكبتى. وسوف نناقش فيما يلى هذه الأنظمة من تنظيم التعبير الجينى بالنسبة للإنزيمات التى لها دور فى ميثابولزم سكر اللاكتوز والحامض الأمينى التربتوفان.

Inducible system

أولاً: النظام التحفيزى

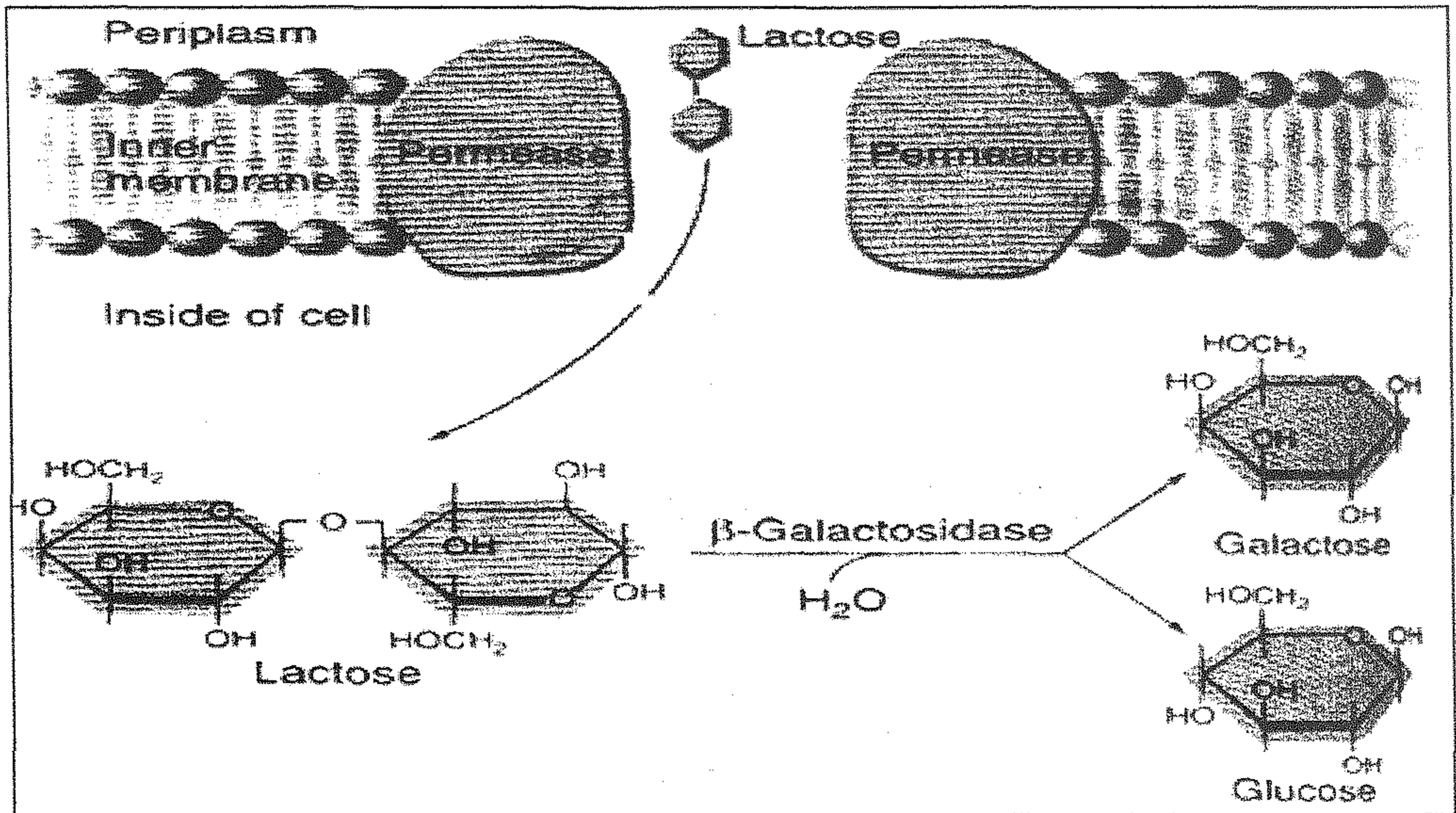
فى بداية عام ١٩٤٦ ومن الدراسات والأبحاث التى أجراها العالم Jacques Monod والى استمرت حتى العقد التالى بواسطة العلماء, Joshua Lederberg, Francois Jacob, Andre L. Wolf تجمعت الأدلة الوراثية والبيوكيميائية لميثابولزم سكر اللاكتوز. وهذه الأدلة قدمت الطريقة التى يكبت بها (Repressed) النشاط الجينى عندما لا يوجد سكر اللاكتوز فى البيئة وتحفيزه (Induced) عندما يكون سكر اللاكتوز متاحاً فى البيئة الغذائية. ففي وجود سكر اللاكتوز فإن تركيز الإنزيمات المسؤولة عن ميثابوليزم سكر اللاكتوز تتزايد بسرعة من عدد قليل من الجزيئات الى آلاف من الجزيئات لكل خلية. وعلى ذلك فإن الإنزيمات المسؤولة عن ميثابولزم سكر اللاكتوز حدث لها تحفيز وان سكر اللاكتوز يعمل كمحفز (Inducer).

وفى الكائنات غير حقيقية النواة تكون الجينات التى تنتج مجموعة من الإنزيمات التى تشترك فى نفس الممر التخليقى الحيوى أو الهدمى متجمعة مثل الجينات التى تنتج إنزيمات ميثابولزم سكر اللاكتوز وان هذه الجينات غالباً ما يحدث لها تنظيم لتعبيرها الجينى بصورة مشتركة فى صورة وحدة تنظيمية واحدة وغالباً ما يكون موقع الوحدة التنظيمية قبل الجينات المتجمعة التى تنظم تعبيرها الجينى وتحدد تفاعلات هذا الموقع المنظم ما إذا كانت الجينات يحدث لها تعبير جينى وبالتالي ستوجد الإنزيمات أو البروتينات التى تنتجها هذه الجينات أو لا يحدث لها تعبير جينى ومن ثم لا تنتج الإنزيمات أو البروتينات. واكتشاف الجين المنظم (Regulator gene) كان له من الأهمية لكى نفهم كيف يحدث التحكم فى التعبير الجينى. وهذه الجينات المنظمة لا تحمل الشفرات اللازمة والضرورية لميثابولزم سكر اللاكتوز والتى هى وظيفة الجينات التركيبية (Structural genes) التى تشكل بالإضافة إلى الجينات المنظمة المجاورة ما يعرف بنظام الاوبرون (Operon system) والتى منها ابرون اللاكتوز (Lactose operon)

Structural Genesالجينات التركيبية

تسمى الجينات التى تحمل شفرات الإنزيمات بالجينات التركيبية ويوجد ثلاثة جينات تركيبية فى اوبرون اللاكتوز (Lac operon) وهى:

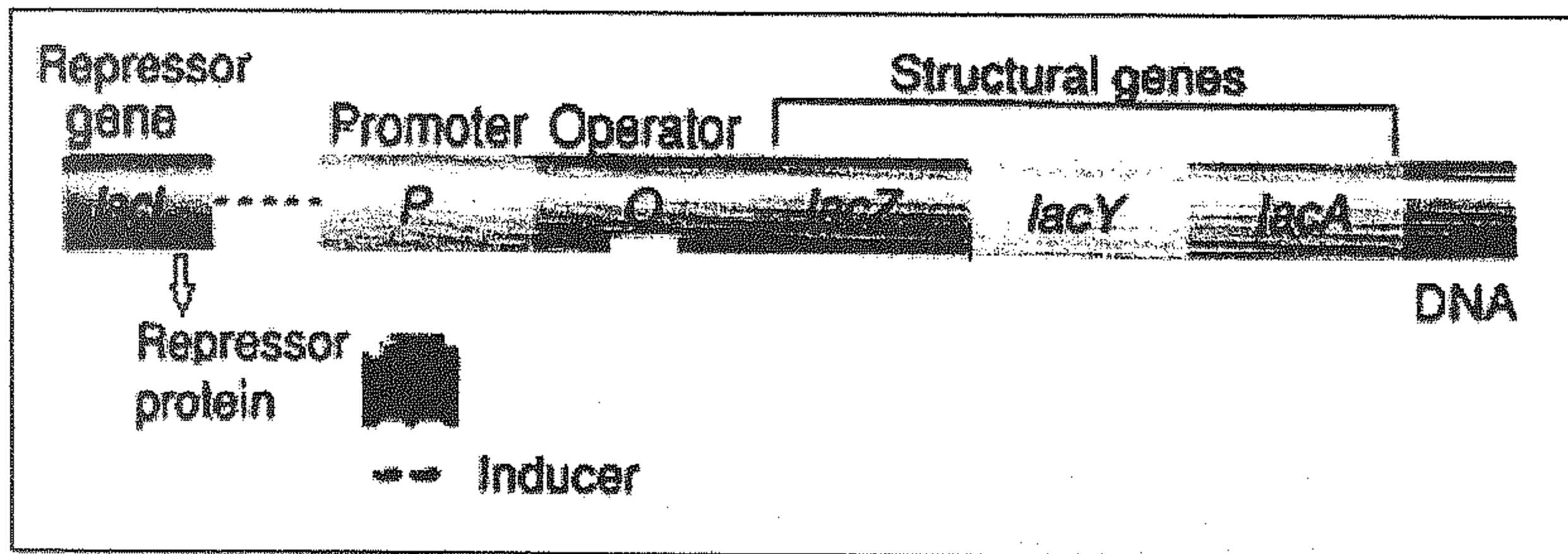
- ١- الجين *lac z* والذى يحمل شفرات إنزيم β -galactosidase ودوره الرئيسى هو تحويل سكر اللاكتوز الثنائى إلى سكر الجلوكوز (Glucose) وسكر الجالكتوز (Galactose) وهذا التحول يعتبر ضرورياً إذا كان اللاكتوز هو المصدر الوحيد للطاقة فى البيئة الغذائية
- ٢- الجين *lac y* الذى يحمل شفرات إنزيم البريميز (Permease) الذى يسهل دخول سكر اللاكتوز إلى داخل الخلية البكتيرية (شكل ٣٥).
- ٣- الجين *lac A* الذى يحمل شفرات إنزيم Transacetylase ودوره الفسيولوجى مازال غير واضحاً تماماً وربما يكون له دور فى إزالة النواتج السامة الناتجة من تكسير سكر اللاكتوز من الخلية.



شكل (٣٥): يوضح دخول سكر اللاكتوز (Lactose) من الجدار الخلوى بمساعدة إنزيم البريميز (Permease) وداخل الخلية البكتيرية يحدث تكسيره بواسطة إنزيم β -galactosidase إلى سكر الجلوكوز (Glucose) وسكر الجالكتوز (Galactose).

نموذج الاوبرون: التحكم السالبThe Operon Model: Negative Control

فى الستينات من القرن العشرين وضع كل من العالمين Jacob و Monod نموذج الاوبرون (Operon model) والذي فيه يحدث تنظيم التعبير الجينى لمجموعة من الجينات والتي يظهر تعبيرها الجينى معاً كوحده تعبيرية واحدة كما هو مشاهد فى ابرون اللاكتوز (شكل ٣٦) .



شكل (٣٦): يوضح مكونات أوبروت اللاكتوز lactose operon وهى:

- ١- الجين الكابت *lacI* (lac I) Repressor gene . ٢- البروموتور *P* (P) Promoter .
- ٣- الأوبريتور *O* (O) Operator .
- ٤- الجينات التركيبية structural genes وهى الجينات *lac A*, *lac Y*, *lac Z* .
- ٥- البروتين الكابت Repressor protein . ٦- المحفز Inducer .

يتركب اوبرون اللاكتوز من الجينات التركيبية الثلاثة *A*, *Y*, *Z* وكذلك موقع الاوبريتور (Operator) والبروموتور (Promoter) وأقترح أن الجين الكابت *lac I* ينظم نسخ الجينات التركيبية عن طريق إنتاجه لبروتين كابت (Repressor) وأنه ذو خاصية allosteric والتي تعنى أنه له القدرة على التفاعل مع جزيء آخر مسبباً تغيراً فى نشاطه الكيميائى ويوضح شكل (٣٧) مكونات اوبرون اللاكتوز وكذلك تفاعل الجين الكابت *lac I* فى وجود وغياب سكر اللاكتوز.

ولقد اقترحا أيضاً ان البروتين الكابت (Repressor protein) الذى ينتجه الجين الكابت lac I يتفاعل بطريقة طبيعية بمنطقة منظمة أخرى تعرف بمنطقة الاوبريتور (Operator) وعندما يحدث ذلك فإنه يثبط تفاعل إنزيم البلمرة RNA polymerase II وبالتالي كبت نسخ الجينات التركيبية (شكل ٣٧) ومع ذلك عندما يتواجد سكر اللاكتوز فى البيئة الغذائية فإن هذا السكر يرتبط بالبروتين الكابت مسبباً حدوث تغييراً فى شكله ووظيفته والذى يؤدي بدوره لفقد قدرته الارتباطية بموقع الاوبريتور (O) وبالتالي يستطيع إنزيم البلمرة RNA polymerase II نسخ الجينات التركيبية ومن ثم تنتج الإنزيمات اللازمة والضرورية لميتابولزم سكر اللاكتوز (شكل ٣٧). ونظراً لأن نسخ الجينات التركيبية يحدث فقط عندما يفشل البروتين الكابت فى الارتباط بموقع الاوبريتور (Operator) فإن هذا النظام من تنظيم التعبير الجيني يكون تحت التحكم السالب (Negative control).

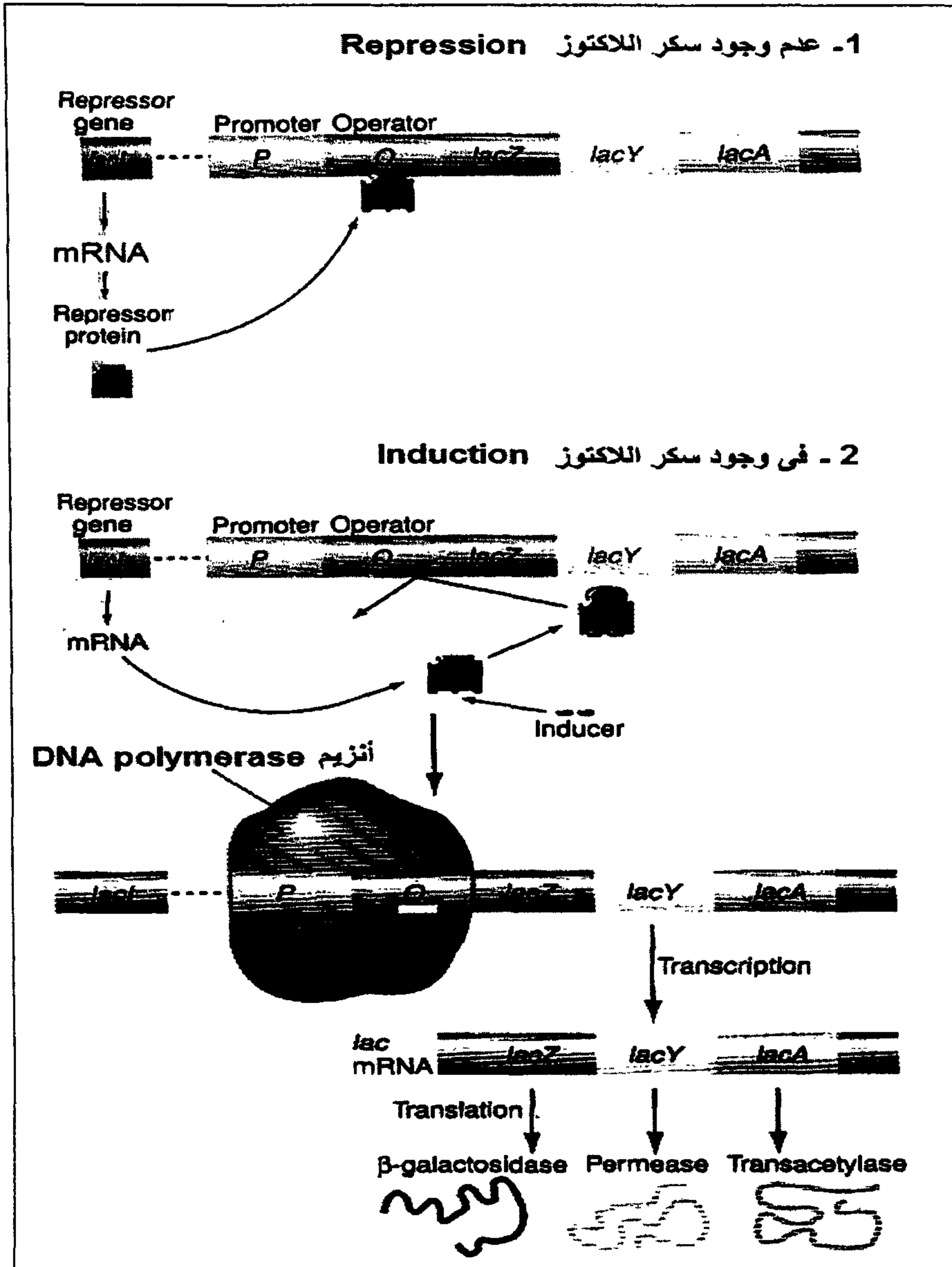
ونموذج الاوبرون (Operon model) يستخدم التفاعلات الكيميائية الكامنة لتفسير كفاءة تنظيم التعبير الجيني للجينات التركيبية. ففي غياب سكر اللاكتوز لا تكون هناك حاجة للإنزيمات اللازمة لميتابولزم سكر اللاكتوز وبالتالي يحدث لها كبت (Repressed) وعندما يتواجد سكر اللاكتوز فإنه يقوم بطريقة غير مباشرة بتحفيز (Induces) نسخ الجينات عن طريق ارتباطه بالبروتين الكابت وإذا حدث ميتابولزم لكل جزيئات سكر اللاكتوز فلن توجد جزيئات منه متاحة لكى ترتبط بالبروتين الكابت والذى يصبح مرة أخرى بصورة حرة تجعله قادراً على الارتباط بموقع الاوبريتور وبالتالي يكبت نسخ الجينات التركيبية.

Isolation of Repressor

عزل الكابت

على الرغم من أن نظرية الاوبرون (Operon theory) التى وضعها العالمين جاكوب (Jacob) ومونود (Monod) نجحت فى تفسير عديد من الآراء المتعلقة بتنظيم التعبير الجيني فى الكائنات غير حقيقية النواة إلا أن طبيعة الجزيء الكابت لم تكن معروفة عندما نشر هذين العالمين بحثهم المتعلق بنظرية الاوبرون ومع ذلك افترضوا أن هذا الكابت هو بروتين ما وكذلك كان الـ RNA مرشحاً لكى يكون هو الكابت لأن نشاط هذا الجزيء يحتاج إلى ارتباطه بالـ DNA.

وعلى الرغم من المحاولات العديدة التى أجريت لعزل وتحديد خواص هذا الجزيء الكابت الافتراضى فإنه لم تتحج هذه المحاولات البحثية فى الحصول على دليل كيميائى مباشر عن طبيعة هذا الجزيء. فالخلية البكتيرية الواحدة من البكتيريا *E. coli* لا تحتوى على أكثر من عشرة جزيئات من هذا الكابت وبذلك فإن التعيين والتحديد الكيميائى المباشر لعشرة جزيئات فى عشيرة مكونة من ملايين من البروتينات والـ RNA الموجودة فى الخلية البكتيرية الواحده يمثل صعوبة فائقة. ومع ذلك استطاع العالمان Hill و Miller عام ١٩٦٦ عزل هذا الكابت الخاص باوبرون اللاكتوز فى صورة شبه نقيه باستخدامهم لسلالة طفرية من البكتيريا *E. coli* تنتج كميات كبيرة من هذا الكابت تعادل عشرة أضعاف الكمية الموجوده فى خلايا الطراز البرى من البكتيريا *E. coli* ووجدا أن هذا الكابت له عديد من الخصائص الموجوده فى البروتينات وفى عام ١٩٩٦ نجح العالمين Lewis و Ponzylu من تحديد التركيب البلورى (Crystal structure) للكابت الخاص بابرون اللاكتوز وبالإضافة إلى حقيقة كونه بروتين استطاع هذين العالمين تحديد طبيعة إرتباط هذا البروتين الكابت بكل من المحفز وبالاوبريتور ، وبذلك أكتملت صورة تنظيم التعبير الجينى للجينات عن طريق نظرية الاوبرون حيث أصبح من المؤكد أن هذا البروتين الكابت (Repressor protein) هو ناتج الجين الكابت (Repressor I gene) والذى هو عبارة عن سلسلة عديدة الببتيد تتركب من ٣٦٠ حامض أمينى وأمكن تحديد موقع إرتباط المحفز بهذه السلسلة عديدة الببتيد وكذلك موقع إرتباطها بالاوبريتور والبروتين الفعلا وظيفياً من هذا البروتين الكابت بتركب من أربعة وحدات بروتينية متماثلة (Homotetamer).



شكل (٣٧) : يوضح تنظيم التعبير الجيني لجينات اوپرون اللاكتوز (Lactose operon)

شرح شكل (٣٧)

١- فى حالة عدم وجود سكر اللاكتوز ينتج الجين الكابت *lac I* البروتين الكابت والذي يرتبط بالـ *لاوبريتور (O)* وبالتالي لا يحدث نسخ للجينات التركيبية ومن ثم لا تتكون الإنزيمات الثلاثة الضرورية لميتابولزم سكر اللاكتوز.

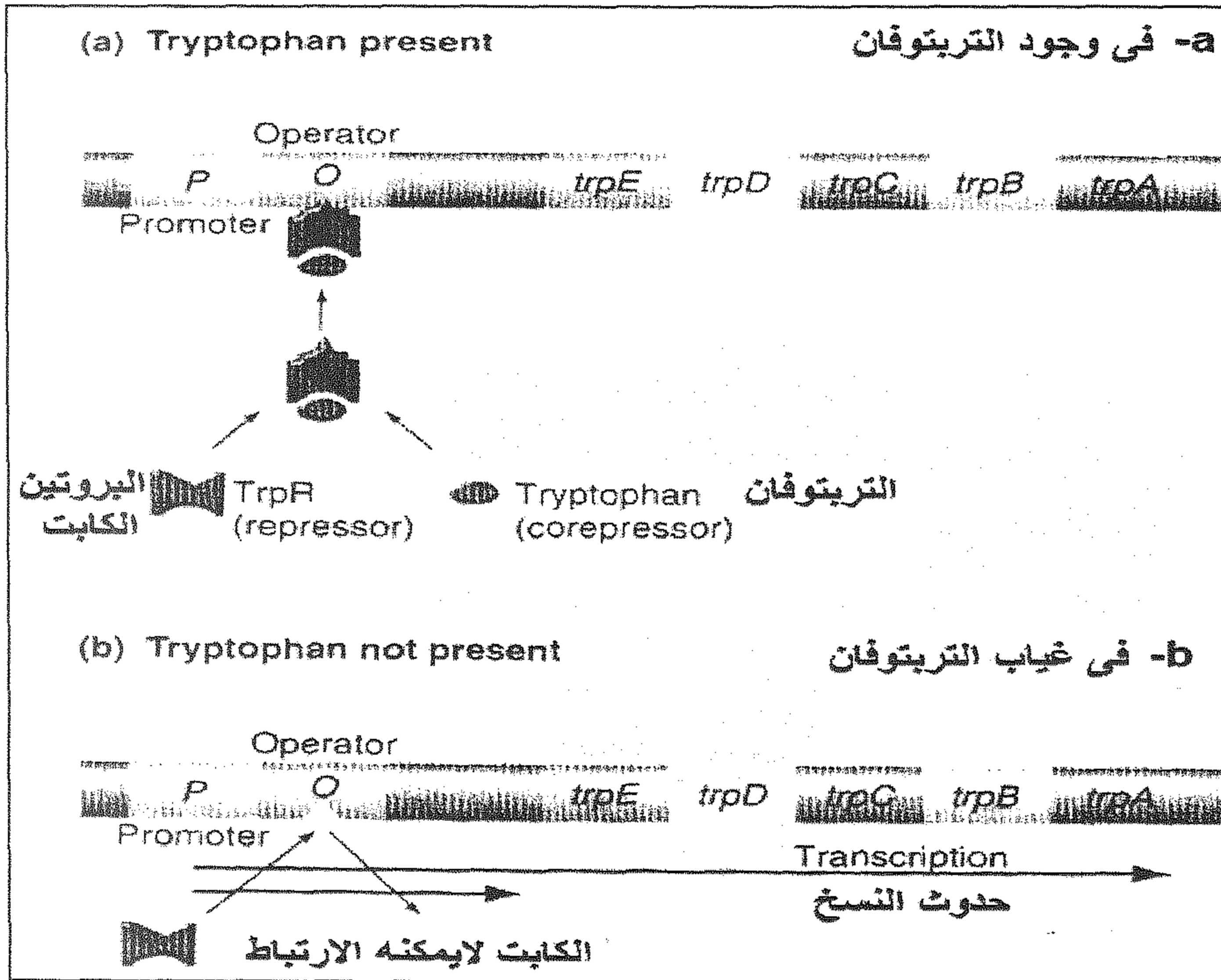
٢- فى وجود سكر اللاكتوز يرتبط سكر اللاكتوز بالبروتين الكابت مما يؤدي إلى عدم قدرته على الارتباط بالـ *لاوبريتور (O)* وبذلك يستطيع إنزيم البلمرة *RNA polymerase* نسخ الجينات التركيبية *lac Y, lac Z, lac A* فى صورة جزئ *mRNA* متعدد السترونات (*Polycistronic Mrna*) والذي تحدث له ترجمة بواسطة الريبوسومات إلى الإنزيمات الثلاثة.

ثانياً: النظام الكبتى *Repressible system*

يمثل اوبرون التربتوفان فى البكتيريا *E. coli* نموذج لتنظيم التعبير الجيني الكبتى فعلى الرغم من أن عملية التحفيز الجيني أصبحت معروفة منذ الأربعينات من القرن العشرين، إلا أنه حتى عام ١٩٥٣ لم يكتشف الاوبرون الكابت (*Repressible operon*) والذي اكتشفه العالم مونود (*Monod*) ومعاونيه بعد ذلك. فالطراز البري من البكتيريا *E. coli* يكون قادراً على إنتاج الإنزيمات الضرورية للتخليق الحيوي للأحماض الأمينية وكذلك التخليق الحيوي للجزيئات الكبيرة الضرورية الأخرى. وإذا أخذنا فى الاعتبار الدراسات التى أجراها العالم مونود (*Monod*) على الحامض الأميني التربتوفان وكذلك على إنزيم *Tryptophan synthase* فقد اكتشف أنه إذا وجد التربتوفان بكميات كافية فى البيئة الغذائية للبكتيريا النامية فإنه لا يحدث إنتاج للإنزيمات الضرورية للتخليق الحيوي لهذا الحامض الأميني ويعتبر الكبت النشاط للجينات التى لها دور فى إنتاج هذه الإنزيمات يمثل درجة عالية فى اقتصاديات الطاقة فى الخلية البكتيرية عندما يوجد التربتوفان فى البيئة الغذائية. ولقد أوضحت دراسات أخرى أن مجموعة الجينات التى تنتج الإنزيمات الضرورية للتخليق الحيوي للتربتوفان تكون متجاورة على الكروموسوم البكتيري فى البكتيريا *E. coli* وهذه الجينات هى جزء من اوبرون (*Operon*) ما وانه فى وجود

التربتوفان يحدث كبت (Repressed) نسخ هذه الجينات بصورة مشتركة وأنه لا يحدث إنتاج لأى من هذه الإنزيمات. ونظراً لوجود التشابه الكبير بين هذا الكبت الإنزيمي والتحفيز الإنزيمي لميتابولزم سكر اللاكتوز. وضع العالمين جاكوب (Jacob) ومونود (Monod) نموذج تنظيم التعبير الجيني الكبتي مماثل لما هو موجود فى اوبرون اللاكتوز. ولتفسير الكبت الإنزيمي اقترحا ان الكابت الطبيعي يكون غير فعال بمفرده على التفاعل والأرتباط بالأوبريتور ومع ذلك فإنه جزئى ذو خاصية Allosteric يمكنه أن يرتبط بالتربتوفان وعندما يوجد هذا الحامض الأميني (التربتوفان) فإن المركب الناتج من الأرتباط بينهما تكسبهما القدرة على الأرتباط بالأوبريتور وبالتالي يكبت (Repressing) نسخ الجينات ولا تتكون الإنزيمات (شكل ٣٨). وحيث أن المركب المنظم يكبت نسخ الاوبرون فإن هذا النظام الكبتي يكون تحت تحكم سالب ونظراً لأن التربتوفان يشترك فى الكبت، فإنه يسمى بإسم (Corepressor) فى هذا النموذج التنظيمي للتعبير الجيني.

ويعتبر تنظيم التعبير الجيني فى البكتيريا للجينات التى يحدث لها تحفيز (Induction) أو كبت (Repression) عن طريق نموذج الاوبرون (Operon model) هو النظام السائد لتنظيم التعبير الجيني للجينات عند مستوى نسخ الجين.



شكل (٣٨) : تنظيم التعبير الجيني لجينات اوبرون التربتوفان (Tryptophan operon)

a. في وجود التربتوفان:

يرتبط التربتوفان بالبروتين الكابت غير الفعال ويحوّله إلى صورة تجعله قادراً على الارتباط بالأوبريتور (O) وبالتالي يحدث قفل (Blocking) لنسخ الجينات التركيبية ومن ثم لا تنتج الإنزيمات الخمسة الضرورية للتخليق الحيوي للحامض الأميني التربتوفان.

b. في غياب التربتوفان:

يقوم الجين الكابت R بإنتاج البروتين الكابت الذي بمفرده لا يستطيع الارتباط بالأوبريتور (O) وبالتالي يستطيع إنزيم البلمرة RNA polymerase نسخ الجينات التركيبية A و B و C و D و E في صورة جزيء mRNA متعدد السسترونات (Polycistronic mRNA) والذي يترجم بعد ذلك إلى الإنزيمات الخمسة الضرورية للتخليق الحيوي للحامض الأميني التربتوفان.

الباب السادس

تنظيم التعبير الجيني في الكائنات حقيقية النواة

Regulation of Gene Expression

In Eukaryotes

أوضحت الدراسات التي أجريت على أجنة حشرة الدروسوفيلا *Drosophila* (ذبابة الفاكهة) وجود أنظمة من التعبير الجيني لعدد من الجينات المختلفة في نفس الجنين مما يدل على وجود نظم دقيقة للتعبير الجيني. فالجينات وكذلك البروتينات التي تنتجها هذه الجينات يجب أن يظهر تعبيرها كما ينبغي في خلايا خاصة وكذلك في الأنسجة الخاصة في الوقت الصحيح والمناسب في الكائنات متعددة الخلايا لكي تنمو ويزدهر نموها.

وغالباً ما يكون تنظيم التعبير الجيني من خلال مجموعة من العمليات التي تتحكم في كمية mRNA الناتج من جين ما وكما لاحظنا من قبل أن تنظيم التعبير الجيني في الكائنات غير حقيقية النواة (Prokaryotes) وكذلك العناصر المنظمة له تحدث عند موقع البروموتور (Promoter) والذي إما أن يكون هذا التنظيم للتعبير الجيني موجباً أو سالباً وذلك بالنسبة لعملية النسخ (Transcription). ومع ذلك ففي الخلايا حقيقية النواة يوجد عدد من النقاط المختلفة التي تتضمنها عملية تنظيم التعبير الجيني وهي:

١- معدل نسخ المنسخ الأولي (hnRNA) Primary transcript.

٢- تحويل المنسخ الأولي (hnRNA) إلى جزيء mRNA الناضج من خلال العملية

المعروفة بإزالة الانترونات ووصل الاكزونات (RNA splicing) وتكوين mRNA الناضج.

٣- ثبات جزيئات mRNA.

٤- معدل ترجمة mRNA إلى البروتين المناسب

٥- العمليات التى تحدث للبروتين بعد الترجمة.

٦- وجود البروتين الناتج من النسخ والترجمة فى الموقع المناسب من الخلية.

٧- ثبات البروتين الناتج من نسخ وترجمة الجين.

وسوف نتناول فيما يلى بعض الآراء حول هذه النقاط السابقة ومع ذلك يوجد خمسة فروق جوهرية بين تنظيم التعبير الجينى فى الكائنات حقيقية النواة والكائنات غير حقيقية النواة (البكتيريا) وهى:

١- تحتوى خلايا الكائنات حقيقية النواة على ثلاثة أنواع مختلفة من إنزيمات البلمرة (RNA polymerases) والتى تتعرف على بروتينات مختلفة وأن هذه الإنزيمات تقوم بنسخ أقساماً مختلفة من الجينات بينما تحتوى خلايا الكائنات غير حقيقية النواة على نوع واحد من إنزيمات بلمرة RNA.

٢- فى الكائنات حقيقية النواة لا يتم نسخ الجينات فى صورة جزيئات من mRNA الناضجة ولكنها تنسخ فى صورة منسخ أولى (hnRNA) والذى ينسخ كل من الاكزونات (Exons) والانترونات (Introns) الموجودة فى الجين (الباب الثانى) وبذلك يجب تحويل هذا المنسخ الأولى إلى جزيء mRNA الناضج عن طريق إزالة الانترونات ووصل الاكزونات والذى ينتقل من النواة إلى السيتوبلازم قبل ترجمته وبالتالي فإن عملية الترجمة غير مرتبطة بعملية النسخ ومن ثم فإن ذلك يعتبر فى غاية الأهمية فى تنظيم التعبير الجينى فى الكائنات حقيقية النواة. بينما فى الكائنات غير حقيقية النواة (البكتيريا) يوجد تداخل بين كل من عملية النسخ والترجمة وذلك لعدم وجود حواجز تمنع اتصال الريبوسومات (Ribosomes) بالمRNA لترجمته للبروتين المناسب بالإضافة إلى أن الجينات البكتيرية لا تحتوى على انترونات ومن ثم فإنها يتم نسخها مباشرة إلى جزيئات mRNA الناضجة والتى يتم ترجمتها مباشرة (الباب الرابع) والأكثر من ذلك أن نفس mRNA

يحمل الشفرات لأكثر من سسترون (Cistrons) والذي يعرف بالـ mRNA متعدد السسترونات والذي يتم ترجمته إلى عديد من أنواع البروتينات المختلفة (الباب الرابع) وهذه الجينات (السسترونات) يتم تنظيم تعبيرها الجيني بواسطة نموذج الاوبرون (Operon model).

٣- معظم الكائنات حقيقية النواة تكون متعددة الخلايا الأمر الذى يتطلب إضافة مستوى آخر من التعقيد إلى نموذج تنظيم تعبير الجين والذي يترتب عليه أن يظهر التعبير الجيني لجين ما بصورة صحيحة فى الخلايا المناسبة وفى الوقت الصحيح. ونظراً لاتصال الخلايا والأنسجة ببعضها فى الكائنات متعددة الخلايا حقيقية النواة فإن ذلك يتطلب توليد نظم دقيقة فى تنظيم التعبير الجيني فى هذه الكائنات حقيقية النواة.

٤- معظم الكائنات حقيقية النواة تحتوى على عديد من الكروموسومات بعكس الحال فى البكتيريا التى تحتوى على كروموسوم واحد مفرد وبذلك فإن تنظيم التعبير الجيني فى الكائنات حقيقية النواة يتطلب تحويل الكروماتين (Chromatin) فى هذه الكروموسومات والأكثر من ذلك أن التعبير الجيني لبعض الجينات فى الكروموسومات المختلفة يجب أن يكون بصورة متناسقة (Coordinate) وربما يتطلب التعبير الجيني للجينات المتجاورة أنظمة مختلفة من التعبير الجيني.

٥- تحتوى خلايا الكائنات حقيقية النواة على عديد من المكونات الخلوية المختلفة ذات الوظائف الخاصة داخل الخلية والتى لا تتواجد فى الخلية البكتيرية فضلاً عن أن البروتينات فى الخلايا حقيقية يجب أن تجد موقعها الصحيح داخل أو خارج الخلية لتقوم بوظائفها الملائمة والذي قد يتطلب حدوث عديد من التحورات المختلفة للبروتين لكي يظهر التعبير الوظيفي للبروتينات فى الكائنات حقيقية النواة.

وسوف نتناول بالشرح الآليات (Mechanisms) التى تستخدمها الكائنات حقيقية النواة لتنظيم التعبير الجيني عند المستويات المختلفة من بداية نسخ الجين وحتى تكوين البروتين الفعال وظيفياً وهذه المستويات من تنظيم التعبير الجيني هى:

١ - تنظيم التعبير الجينى عند مستوى النسخ

Transcriptional level regulation

٢ - تنظيم التعبير الجينى عند مستوى ما بعد النسخ

Posttranscriptional level regulation

٣ - تنظيم التعبير الجينى عند مستوى الترجمة

Translational level regulation

٤ - تنظيم التعبير الجينى عند مستوى ما بعد الترجمة

Posttranslational level regulation

أولاً : تنظيم التعبير الجينى عند مستوى النسخ

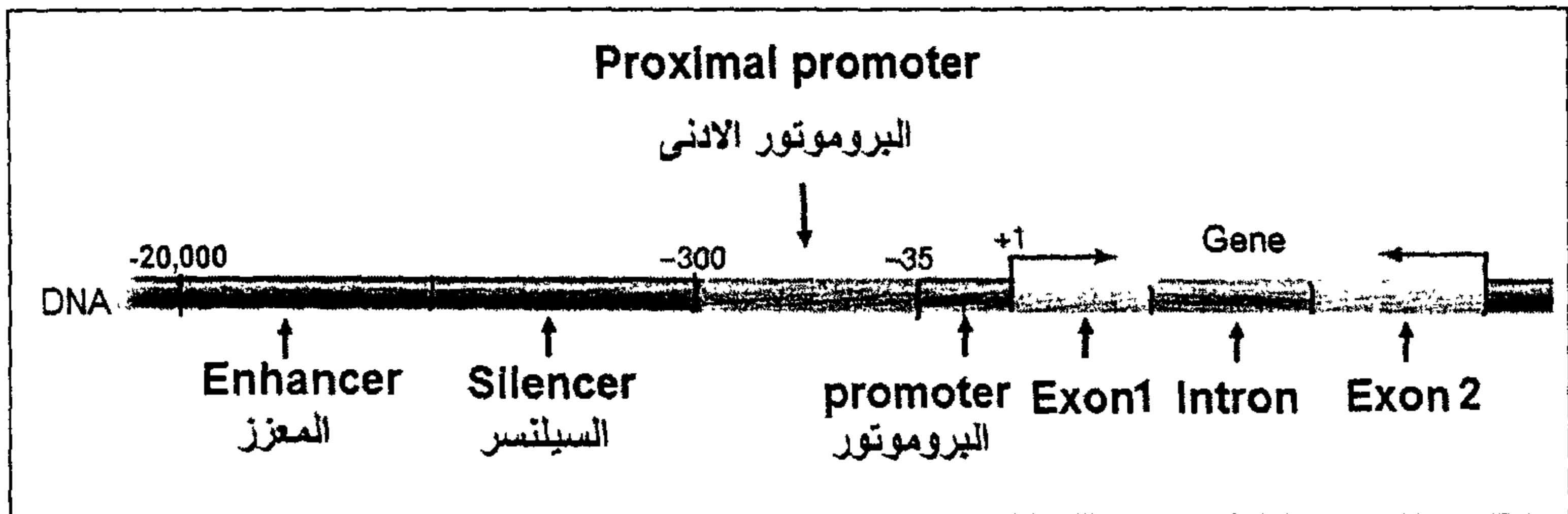
Transcriptional level regulation

يقصد بتنظيم التعبير الجينى عند مستوى النسخ هو تنظيم نسخ الجين وتكوين جزيئات الـ hnRNA من عدمه ولذلك سوف نتناول العناصر اللازمة لنسخ الجين وهى البروموتور (Promoter) والبرموتور الادنى (Proximal promoter) والمعرز (Enhancer) والسييلنسر (Silencer) (شكل ٣٩):

١ - البروموتور (Promoter)

يتركب البروموتور الذى يتعرف عليه إنزيم البلمرة (pol II) من عنصرين هما منطقة البداية (Intiation region (InR) وتقع مجاورة لموقع بداية النسخ والتتابع النيوكليوتيدى المعروف بصندوق TATA (TATA box) أو بصندوق هوجنز (Hogness box) والذى يقع على بعد حوالى ٢٥ يوكليوتيدة شمال منطقة البداية (InR). وعلى الرغم من أن كلا التتابعين السابقين كافيين لارتباط المركب البروتينى الأولى (Pre-initiation complex (PIC) لبدا النسخ وابتداء إنزيم البلمرة (pol II) البداية الصحيحة عند الموقع الصحيح إلا أن إنزيم البلمرة غير قادر بالصورة الكافية على تحديد موقع البروموتور بذاته والارتباط به والذى يتطلب تكوين المركب البروتينى الأولى لبداية النسخ ليرتبط

بالبروموتور ومن ثم يساعد فى ارتباط إنزيم البلمرة (pol II) بالبروموتور قبل أن تبدأ عملية نسخ الجين ويضم مركب بداية النسخ البروتينى الأولى (PIC) مجموعة كبيرة من الوحدات البروتينية المختلفة من بينهما الوحدة البروتينية التى ترتبط بالصندوق (TATA box) من البروموتور والمعروفة باسم TATA-binding proteins (TBP) مما يؤدي ذلك إلى تعزيز ارتباط عوامل النسخ الأخرى من الارتباط بالبروموتور. وكذلك ارتباط إنزيم البلمرة pol II بالـ DNA عند تتابع معين محدد (البروموتور) وينتج عن ذلك كله تكوين مركب بداية النسخ الأولى والذي يسمح بحدوث المستوى الأساسى basal level من النسخ ولحدوث أعلى معدل من مستوى نسخ الجين يكون من خلال ارتباط بروتينات أخرى معينة بمناطق كل من المعزز (Enhancer) وبعناصر البروموتور الأدنى (Proximal-promoter).



شكل (٣٩): يوضح العناصر اللازمة لنسخ الجين وهى البروموتور (Promoter) والبروموتور الأدنى (Proximal promoter) والمعزز (Enhancer) والسيلنسر (Silencer) .

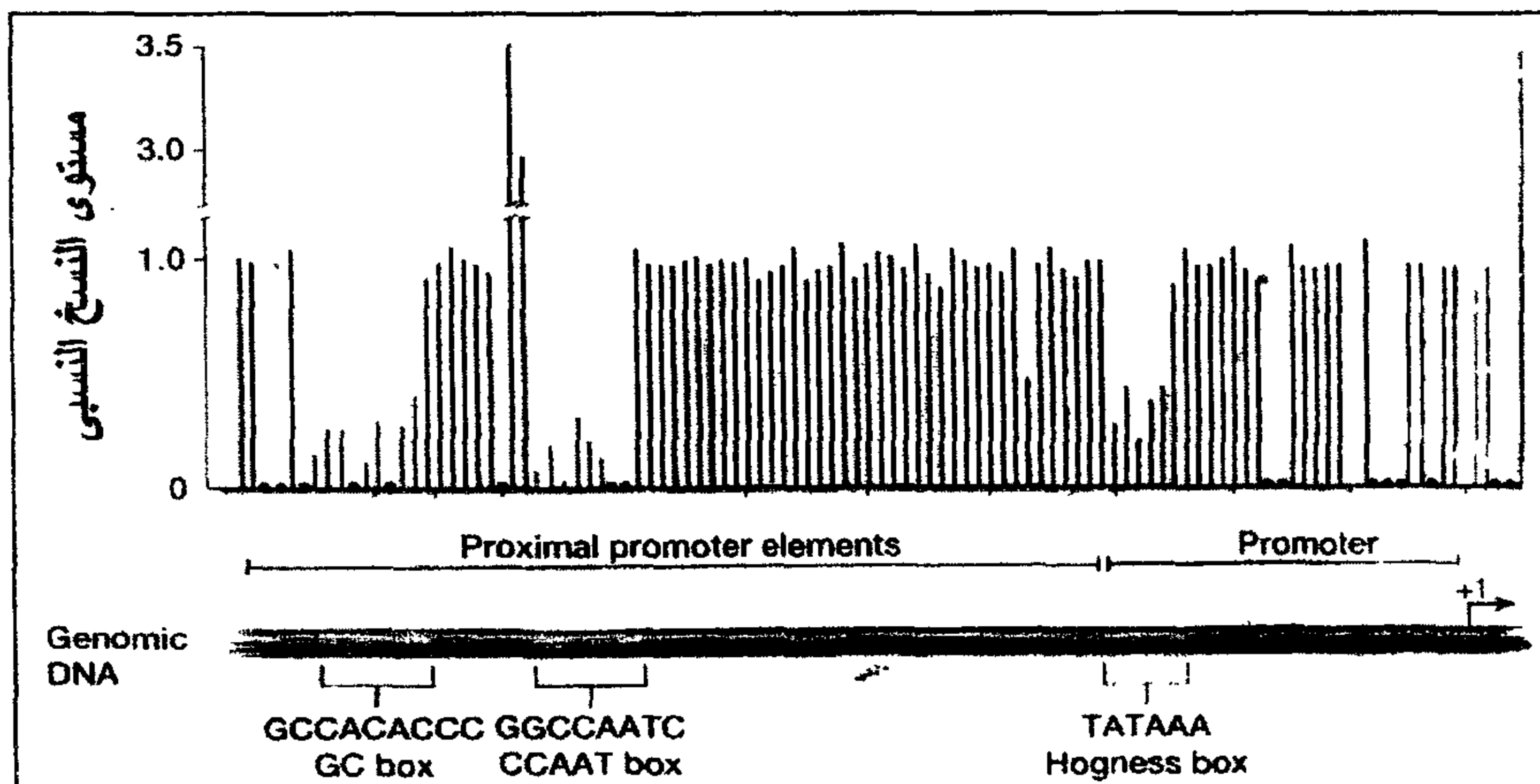
Proximal-Promoter Elements

٢- عناصر البروموتور الأدنى

عناصر البروموتور الأدنى ضرورية لتوجيه مستوى النسخ المناسب لجين ما. وعادة ما توجد هذه العناصر فى التتابعات النيوكليوتيدية الأولى فى الجزء الشمالى من البروموتور على الرغم من أنها أحياناً قد تمتد فى الطول أكثر من ذلك. وهذه التتابعات النيوكليوتيدية يرتبط بها بروتينات معينة والتى إما أن تنشط (Activate) أو تكبت (Repress) عملية النسخ وربما يحتوى الجين الواحد على أكثر من عشرة مواقع مختلفة من هذه التتابعات النيوكليوتيدية والتى يرتبط

بها منشطات أو مكبتات عملية النسخ التى تحدد ما إذا كان الجين سيتم نسخه وبأى مستوى. ولقد أمكن تحديد قسمين رئيسيين من عناصر البروموتور الأدنى وهما:

أ- **عناصر البروموتور الأدنى الوراثية (Generic proximal-promoter)** وهى عبارة عن الصندوق (CCAAT box) وكذلك الصندوق (GC box) وتقع هذه التتابعات النيوكليوتيدية على شمال الجين بيتاجلوبين (β -globin gene) كما هو مبين فى (شكل ٤٠). ولقد أمكن استحداث طفرات فى هذه المواقع عند مواقع نيوكليوتيدية معينة باستخدام المطفرات التى تسبب الطفرات الموضعية الموجهة (Site-directed DNA mutagenesis) (Ploted) ويمكن توقيع موقع الطفرات بالنسبة لمعدل النسخ النسبى بالنسبة للطفرات المستحدثة الموجهة (شكل ٤٠)



شكل (٤٠) : يوضح الطفرات التى تحدث فى بروموتور جين بيتاجلوبين (β -globin gene) وكذلك الطفرات التى تحدث فى البروموتور الأدنى (Proximal promoter) وتأثيرها على مستوى نسخ الجين حيث تم استحداث طفرات عند مستوى التغير فى يوكليوتيدة واحدة فى المنطقة شمال (Upstream) الجين بيتا جلوبين وتم تقدير مستوى للنسخ لكل طفرة. والموقع النسبى لكل طفرة يمثل بخط رأسى فى هذا الشكل بينما يمثل ارتفاع هذا الخط الرأسى مستوى النسخ لكل طفرة بالمقارنة بالبروموتور الطبيعى ويتضح من هذا الشكل أن الطفرات التى حدثت فى المناطق الثلاثة وهى Hogness box و GC box و CCAAT box سببت انخفاضاً معنوياً فى مستوى نسخ الجين بينما الطفرات التى وقعت خارج هذه المناطق الثلاثة السابقة كان لها تأثير منخفض جداً على النسخ.

ووجد أن الطفرات التي تحدث في المناطق الثلاثة المختلفة وهي صندوق هوجنز (Hogness box) والصندوق (CCAAT box) والصندوق (GC box) سببت انخفاضاً معنوياً في معدل نسخ الجين بيتا جلوبيين بينما الطفرات التي حدثت خارج هذه المناطق الثلاثة السابقة لم يكن لها تأثير يذكر على معدل نسخ الجين وعلى ذلك فإن التتابع النيوكليوتيدي المكون من ٣٠٠ يوكليوتيدة على شمال جين بيتا جلوبيين والممثلة في العناصر الثلاثة السابقة تمثل العناصر الرئيسية التي يتطلبها المستوى المناسب لنسخ الجين. والأكثر من ذلك أنه إذا تحرك أي من الصندوقين (CCAAT box) أو (GC box) بعيداً عن الصندوق هوجنز (TATA box) إلى مكان آخر فإنهما يفقدان قدرتهما على تنشيط أعلى معدل من النسخ الجيني وبالتالي فإن هذه العناصر الوراثية تتطلبها عملية تنظيم كمية نسخ الجين أكثر من أنها تتحكم في أين ومتى يحدث النسخ الجيني .

وتوجد البروتينات التي ترتبط بالصندوق (GC box) والصندوق (CCAAT box) في كل الخلايا والتي تحدد مقدرة هذه التتابعات النيوكليوتيدية في توجيه الخلايا أو الأنسجة الخاصة على عملية النسخ حيث يرتبط البروتين (SPI) بالصندوق (GC box) بينما يرتبط عامل النسخ البروتيني (CTF) بالصندوق (CCAAT box). والسؤال الذي يطرح نفسه كيف تساعد هذه البروتينات في التأثير على مستوى نسخ الجين؟.

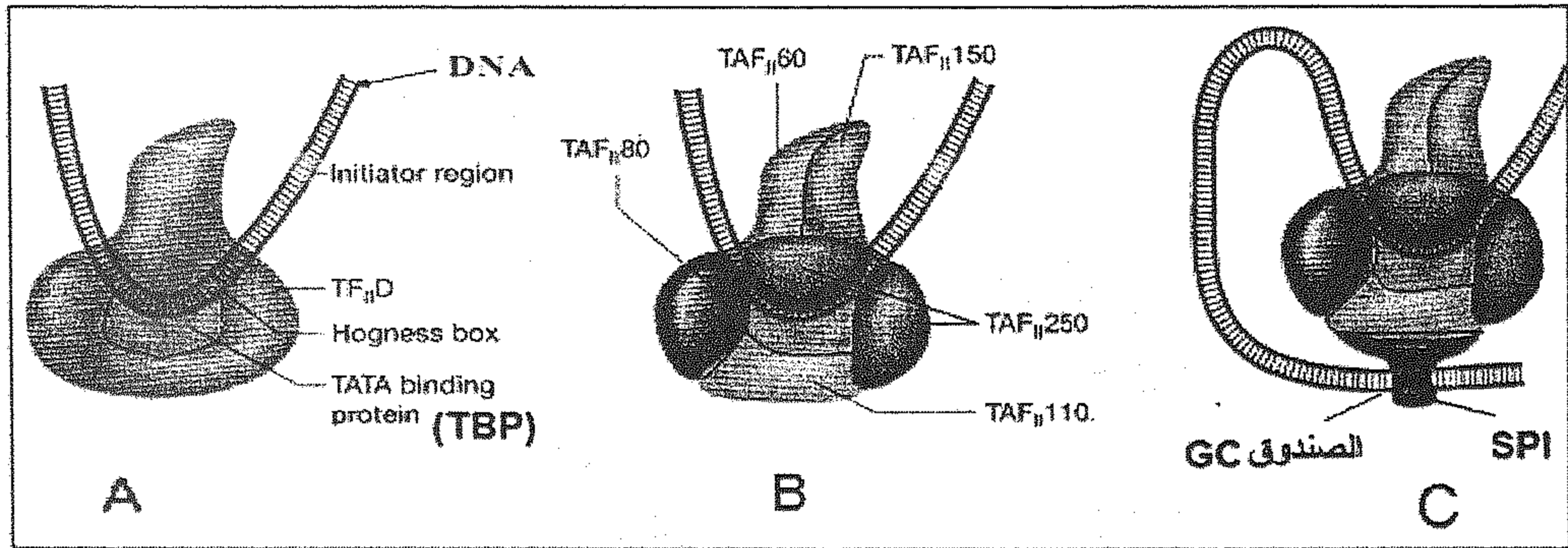
ويمكننا تصور النموذج (Model) الذي يربط عامل بداية النسخ (TFIID) إنزيم البلمرة Pol II بالبروموتور من خلال الوحدة البروتينية (TBP) والمرتبطة بصندوق هوجنز وكذلك ارتباط الوحدة البروتينية (TAFII150) والوحدة البروتينية (TAFII250) بمنطقة البداية (InR) كما هو مبين في (شكل ٤١) فعندما يوجد الصندوق (GC box) على البعد المناسب من الصندوق هوجنز فسوف يرتبط البروتين (SPI) بالصندوق (GC) كما يساعد في ارتباط وثبات مركب بداية النسخ (TFIID) من خلال تفاعله مع الوحدة البروتينية (TAFII 110) كما هو مبين في (شكل ٤١) وسوف يؤدي هذا التفاعل إلى زيادة في كفاءة بداية النسخ مما يترتب عليه إنتاج المنسخ الأولي (hnRNA) من الجين بمستوي مرتفع.

ب- عناصر البروموتور الأدنى المتخصص للخلية أو النسيج

Cell or tissue specific-proximal-promoter elements

تسلك عناصر هذا البروموتور الأدنى المتخصص للخلية أو النسيج من حيث الوظيفة نفس سلوك عناصر البروموتور الأدنى الوراثة، ومع ذلك يوجد اختلافين أساسيين بين عناصر هذا البروموتور الأدنى المتخصص للخلية أو النسيج وعناصر البروموتور الأدنى الوراثة وهما:

- ١- عدد العناصر المتخصصة للخلية أكبر بكثير معنوياً والتي توجد في المنطقة شمال الجين عن العناصر الوراثة للبروموتور الأدنى.
- ٢- البروتينات التي ترتبط بهذه العناصر المتخصصة للخلايا والأنسجة تظهر في مجموعة من الخلايا في الكائن عند أوقات معينة أثناء النمو ومن ثم فإن نظام ظهور هذه البروتينات التي ترتبط بالـ DNA سوف يحدد ويملى التعبير الجيني للجين.



شكل (٤١) : نموذج يوضح دور عناصر البروموتور الأدنى الوراثة في تنظيم التعبير الجيني

- A. نموذج ارتباط البروتين (TBP) بصندوق هوجنز وارتباط البروتين (TFII D) بمنطقة البروموتور وارتباط البروتين TBP بصندوق هوجنز (Hogness box) يسبب انثناءاً معنوياً للـ DNA
- B. نموذج تفاعل الوحدات البروتينية (TAFII 150) و (TAFII 250) بمنطقة البداية (InR) وإضافة وحدات بروتينية أخرى إلى مركب بداية النسخ (TFII D).
- C. نموذج ارتباط البروتين (SPI) بالصندوق (GC box) والذي يقع على شمال صندوق هوجنز. هذا البروتين (SPI) يتفاعل أيضاً مع البروتين (TAFII 110) الموجود في مركب بداية النسخ (TFII D) وذلك للمساعدة في ارتباطه أو تثبيته بمنطقة البروموتور قبل أن تبدأ عملية النسخ.

ويقترح أن تنظيم التعبير الجيني بمثل هذا النموذج أن نسخ الجين يعتمد على عوامل النسخ الموجودة أو غير الموجودة فى خلية معينة. والمقدرة على تمييز خلية معينة يحدث فيها النسخ يعتمد على ظهور عوامل النسخ التى ترتبط بالـ DNA (شكل ٤٢). وفى هذا المثال يوجد ثلاثة عوامل نسخ مختلفة لتنشيط عملية النسخ وهى البروتينات P, R, G وعن طريق ظهور هذه البروتينات الثلاثة المختلفة فى الأنظمة الخلوية المختلفة فسوف يتولد سبعة أقسام فريدة والتى فى أى منها يظهر تعبير أحد هذه البروتينات الثلاثة على الأقل وبالتالي فإن هذه البروتينات الثلاثة سوف تسمح بإنتاج سبعة أنظمة مختلفة للنسخ والتى يجب أن تتناظر الأنظمة الموجودة فى الخلايا المختلفة أو الأنسجة المختلفة وهى التى يظهر فيها تعبير البروتينات التالية GRP أو G أو GR أو P أو R أو P أو RP. ويجب أن نلاحظ أن عامل النسخ سوف يظهر فى نسيج واحد أثناء النمو ثم بعد ذلك يتلاشى من هذا النسيج ثم يظهر فى نسيج آخر فى مرحلة متأخرة من النمو. وظهور عامل النسخ الواحد فى أوقات مختلفة من النمو يسمح للبروتين بالتفاعل مع منشطات النسخ فى مجموعة متنوعة من الخلايا أو الأنسجة. وهذا التعبير الجيني المعقد يعتبر أحد الآليات (Mechanisms) لتوليد نظام محكم ودقيق لتنظيم التعبير الجيني عند مستوى النسخ والذى تحتاجه الكائنات متعددة الخلايا.

وفى هذا النموذج الافتراضى أفترضنا ثلاثة أنواع مختلفة من البروتينات التى ترتبط بالـ DNA وهى البروتينات G و R و P وتمثل المربعات المظلمة تعبير البروتين المناظر فى خلية معينة وبالأخذ فى الاعتبار التوافق المختلفة بين هذه البروتينات الثلاثة المختلفة فإنه يمكن تحديد سبعة طرز خلوية (Cell types) سوف يظهر فيها احد هذه البروتينات الثلاثة على الأقل والتى ترتبط بالـ DNA.

طرز البروتينات المختلفة	Protein G						
	Protein R						
	Protein P						
Cell type	GRP	G	GR	GP	R	P	RP

طرز الخلايا المختلفة

شكل (٤٢): يوضح نموذج افتراضي لتنظيم التعبير الجيني عن طريق طرز البروتينات المختلفة

Enhancers

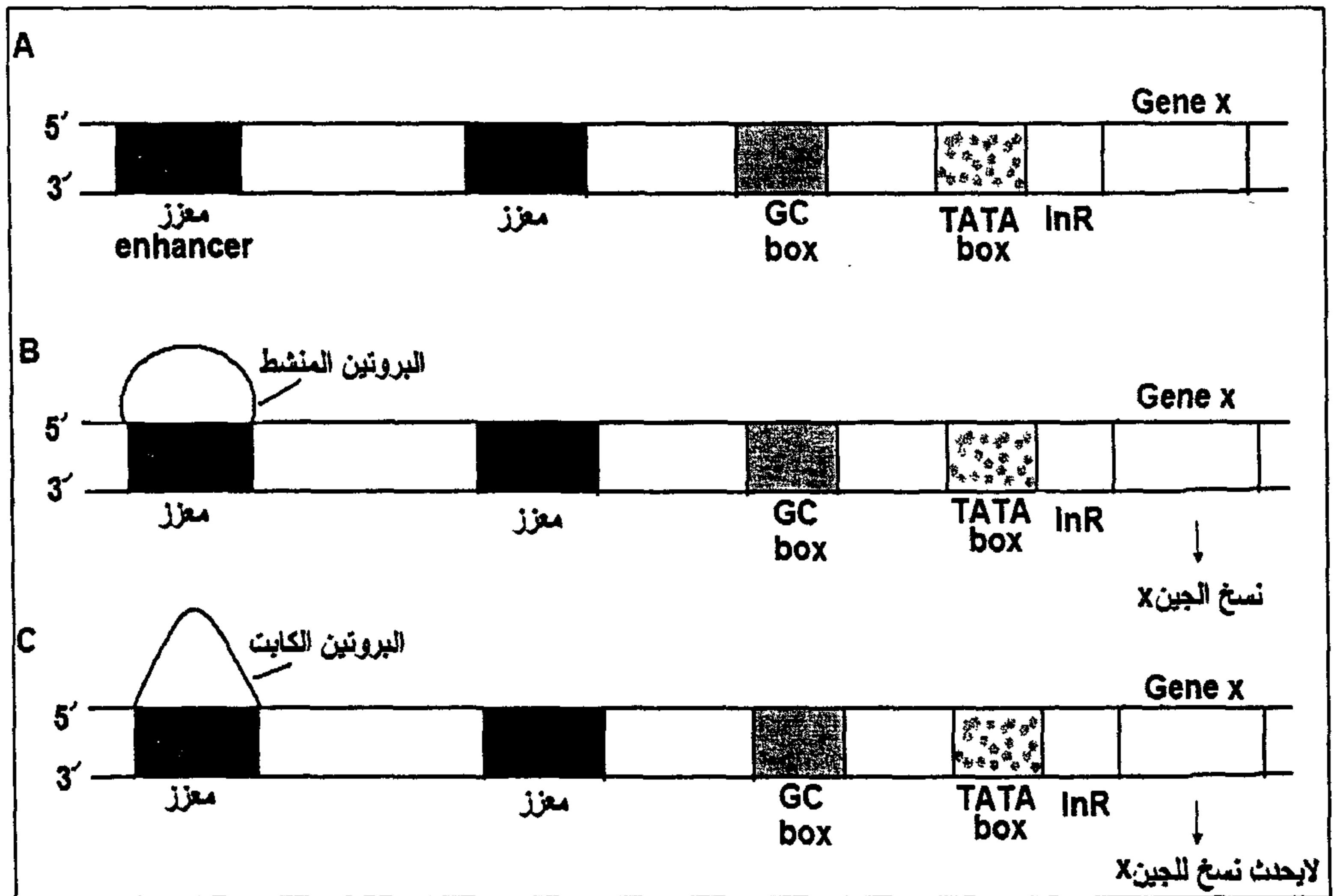
المعززات

المعززات هي تتابعات من الـ DNA والتي يرتبط بها البروتينات للتحكم في نسخ جين ما في خلية ما أو نسيج ما. وتسمى البروتينات التي ترتبط بالمعززات بالمنشطات (Activators) وذلك لأنها تسبب زيادة في نسخ الجين. ومع ذلك فإن البروتينات الكابته (Repressors) يمكنها أيضاً أن ترتبط بالمعززات وتسبب كبت نسخ الجين. ومهما كانت المسافة بين المعزز والجين فإنها لا تفقده قدرته على تنظيم نسخ الجين، فعلى سبيل المثال قد تكون المسافة بين المعزز والجين مقدارها حوالي ١٠٠٠٠ يوكليوتيدة يمي أو شمال الجين ومع ذلك يظل قادراً على اظهار تأثيره على تنظيم نسخ الجين. وعلى العكس من ذلك اذا تحرك الصندوق GC عن موضعه الطبيعي لمسافة مقدارها ٥٠ يوكليوتيدة شمال الجين سوف يمنع من تنشيط نسخ الجين.

ويتحكم عناصر البروموتور الأدنى في مستوى نسخ جين ما وأن فقد مثل هذه العناصر ينتج عنه نقص كبير في مستوى نسخ الجين. وعلى العكس من ذلك فإن المعززات تؤثر على أعلى مستوى لنسخ الجين وكذلك تتحكم في نظام التعبير الجيني من حيث الوقت والنسيج الذي يحدث فيه نسخ الجين وعلى ذلك فإن فقد معزز ما يعني انه سوف يحدث اختزال في نسخ الجين وكذلك

حدوث نسخ للجين فى الوقت الخطأ والنسيج الخطأ. كذلك اذا تحرك معزز ما بالقرب من جين آخر فسوف يوجه نسخ هذا الجين الآخر.

وتقوم المعززات بدورها فى تنظيم نسخ جين ما من عدمه من خلال احتوائها على مواقع ارتباط البروتينات التى يتعرف عليها عوامل النسخ المنشطة لنسخ الجين أو تلك التى تكبت نسخ الجين (شكل ٤٣).



شكل (٤٣): نموذج يوضح كيفية تأثير البروتينات التى ترتبط بالمعززات (Enhancers) على عملية النسخ

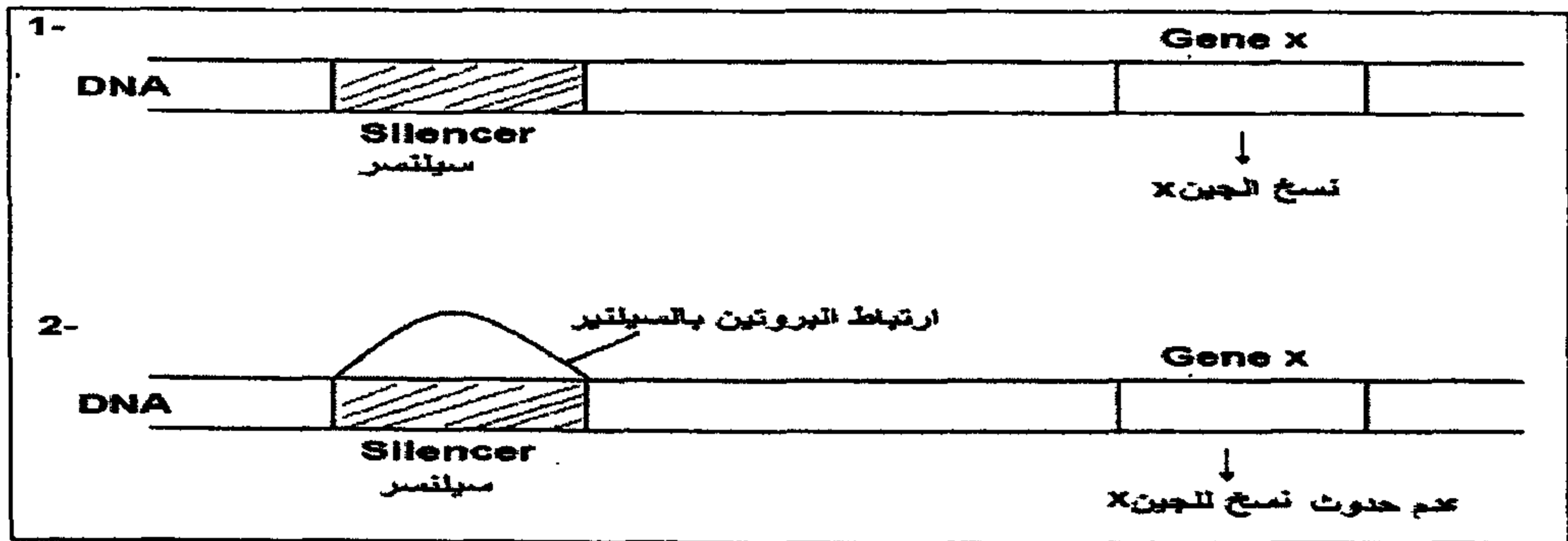
A. الترتيب الطولى لمواقع الارتباط بالـ DNA شمال الجين وكذلك موقع بداية النسخ الموجود داخل منطقة بداية النسخ (InR) والمعززين (Enhancers) على شمال الصندوق (GC box) .

B. ارتباط البروتين المنشط بالمعزز يسبب حدوث نسخ للجين x .

C. ارتباط البروتين الكابت بنفس بالمعزز يسبب عدم حدوث نسخ للجين x

٤- السيلنسرز Silencers

السيلنسرز هى أيضاً تتابعات من الـ DNA تنظم نسخ الجين من عدمه عن طريق ارتباط البروتينات بها. وفى الكائنات حقيقية النواة تعتبر السيلنسرز هى طراز من تنظيم التعبير الجينى السالب حيث يحدث نسخ للجين فى حالة عدم ارتباط البروتين بالسيلنسر بينما لا يحدث نسخ للجين عندما يرتبط البروتين بالسيلنسر (شكل ٤٤). والسيلنسرز التى تكبت نسخ الجين يرتبط بها البروتينات التى تغير شكل الـ DNA حيث يرتبط بعض البروتينات بسيلنسرز خاصة وتتحور الكروماتين لجين ما من الطراز ايوكروماتين (Euchromatin) إلى الطراز هتروكروماتين (Heterochromatin) وبالتالى لا يحدث نسخ للجين أو يكبت نسخ الجين.

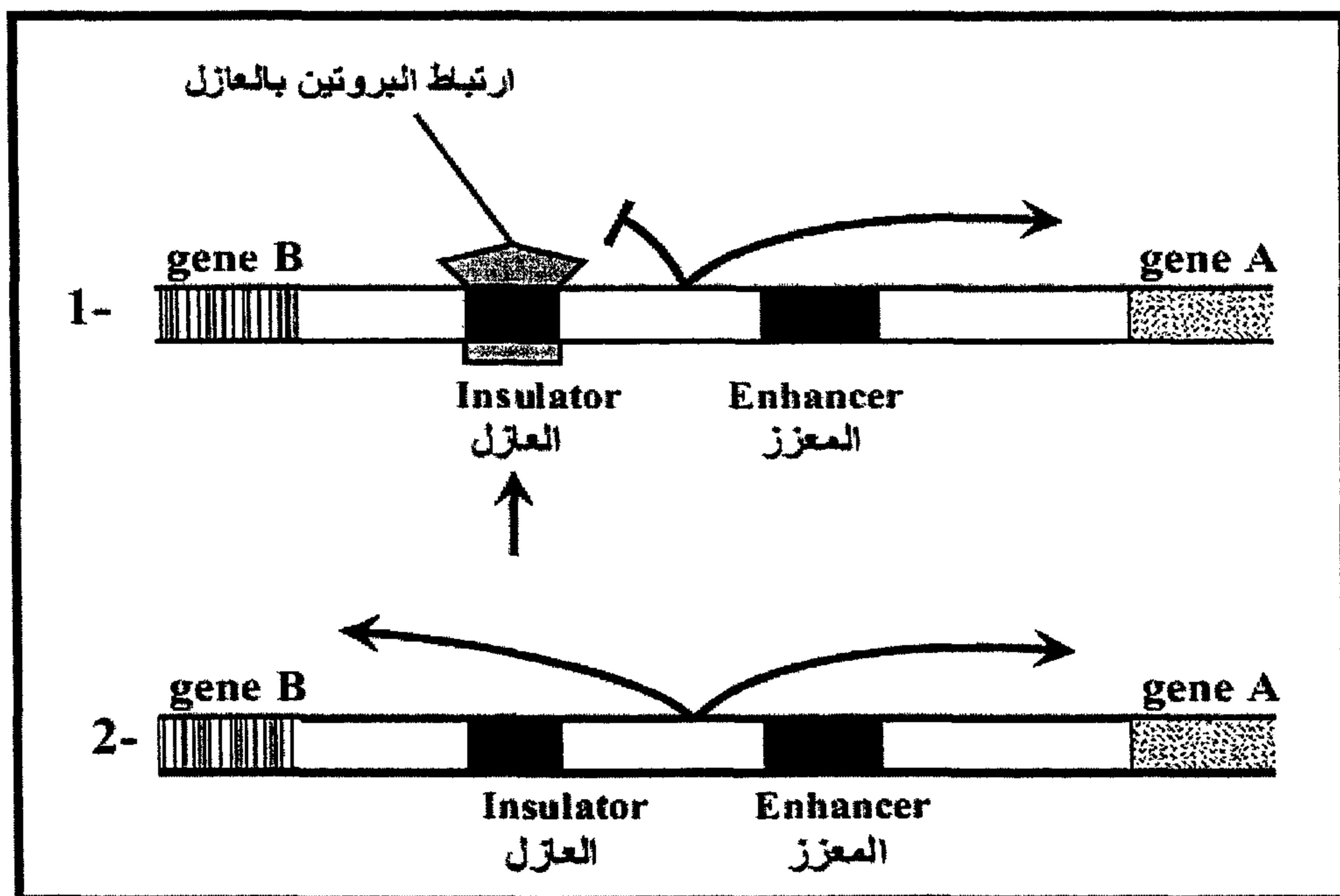


شكل (٤٤): تأثير السيلنسر (Silencer) على عملية النسخ يقع السيلنسر على مسافة ١٠٠٠٠ يوكليوتيدة شمال الجين الذى يتحكم فى نسخه. اما الجين الذى يحدث له نسخ لا يرتبط بالسيلنسر أى بروتين (1). ومع ذلك عندما يرتبط البروتين بالسيلنسر فإنه يكبت (Suppress) عملية النسخ (2).

٥- العازلات Insulators

من أهم خصائص المعززات (Enhancers) والسيلنسرز (Silencers) الهامة هى قدرتها فى أن تكون فعالة وظيفياً سواء كانت فى شمال أو يمين الجين حتى ولو كانت على مسافات بعيدة من جين ما. والعازلات عبارة عن عناصر من الـ DNA تحجب جين ما من تأثير المعزز المجاور لهذا الجين (شكل ٤٥).

والعازلات عبارة عن تتابعات من الـ DNA يرتبط بها البروتينات التى تتعرف على هذه العازلات . فعلى سبيل المثال فإن العازلات فى حشرة الدروسوفيلا (*Drosophila*) تحتوى على التتابع النيوكليوتيدى الثابت والمحفوظ وهو GAGA والذي يرتبط به البروتين TrL. فإذا حدث طفور لأى من التتابع GAGA أو البروتين TrL يصبح العازل غير فعال وظيفياً. ومع ذلك فإن الآلية التى بواسطتها تغلق العازلات تأثير المعززات مازالت غير معروفة.



شكل (٤٥): يوضح نموذج تفاعل العازل (A model for insulator action)

- 1- وقوع عازل ما (Insulator) بين الجين B والمعزز (Enhancer) سوف يمنع المعزز من تنشيط نسخ الجين B عندما يرتبط بالعازل بروتين ما.
- 2- فقد الارتباط بين البروتين والعازل سوف يسمح بالمعزز من التحكم فى نسخ الجين B ومن ناحية أخرى يتم تنظيم نسخ الجين A بواسطة نفس المعزز.

تنظيم نسخ الجين بواسطة هرمون الثيرويد

Regulation of gene transcription by thyroid hormone

يلعب عنصر الاستجابة لهرمون الثيرويد (THRE) والذى يوجد على شمال عديد من الجينات دوراً فى تنظيم التعبير الجينى. فعندما يرتبط مستقبل هرمون الثيرويد بهذا الهرمون ثم بعد ذلك يرتبطان بعنصر الاستجابة لهرمون الثيرويد (THRE) فإنه ينشط نسخ الجين وعندما يرتبط مستقبل هذا الهرمون فقط بعنصر الاستجابة للهرمون فإنه يكبت نسخ الجين. وفى مثل هذا السلوك فإن الجين الذى يحدث له نسخ بمستوى أساسى منخفض سوف يحدث زيادة فى نسخه فى وجود الهرمون أو يخضع لمزيد من انخفاض معدل النسخ فى غياب الهرمون وبالتالي يؤثر وجود أو غياب هرمون الثيرويد على تنظيم نسخ الجين (شكل ٤٦). ويمكن تلخيص ما سبق فى النقاط التالية:

١- التتابعات النيوكليوتيدية الهامة فى تنظيم نسخ جين ما هى:

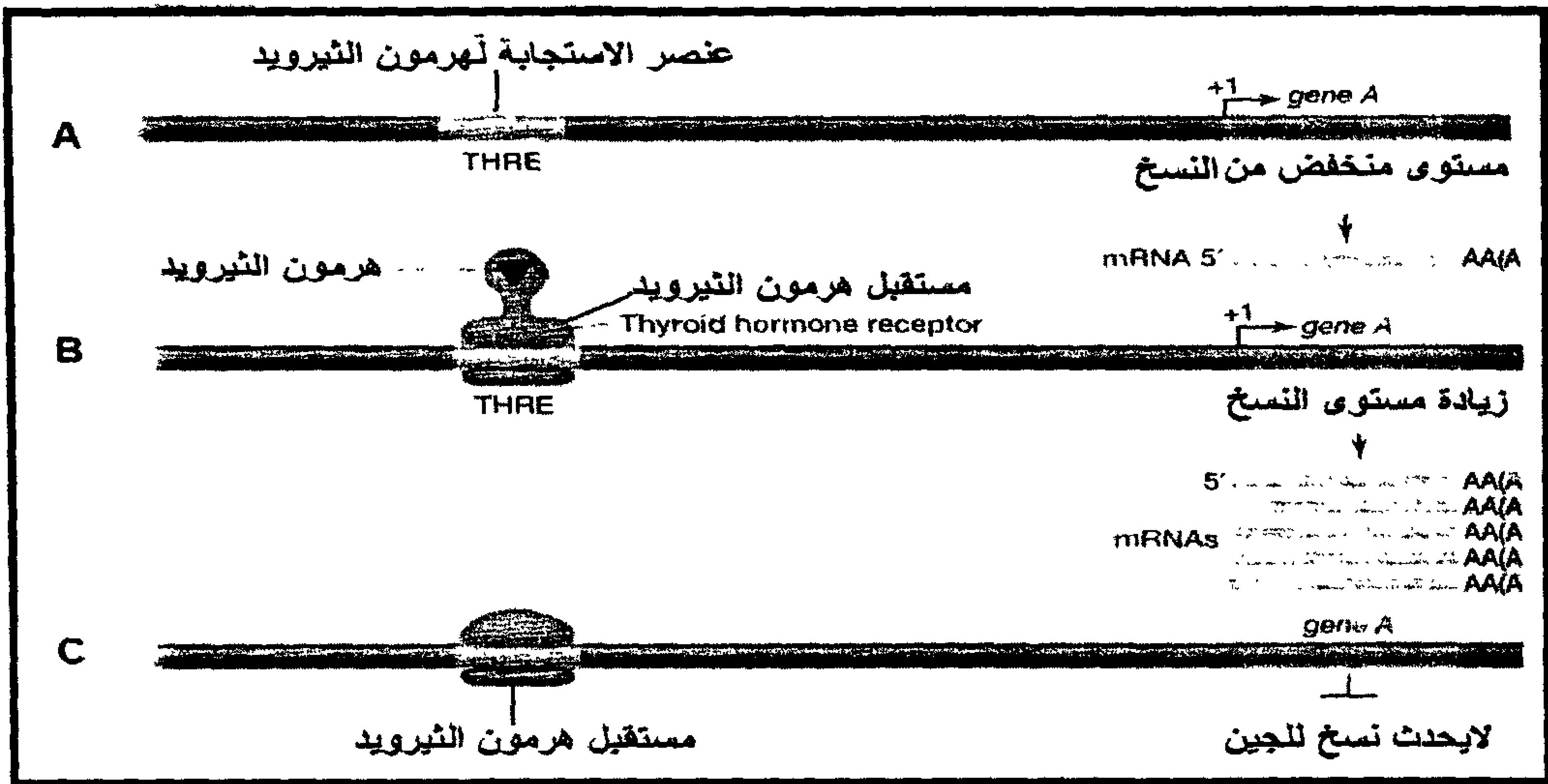
- البروموتور (Promoter)
- البروموتور الأدنى (Proximal-promoter)
- المعززات (Enhancers)
- السيلنسرز (Silencers)
- العازلات (Insulators)

٢- ينظم كل من البروموتور والبروموتور الأدنى المستوى الأساسى لنسخ جين ما وإذا تغير موقع كل من البروموتور والبروموتور الأدنى معنوياً بالنسبة لموقعهما من موقع بداية نسخ الجين فإن ذلك يؤثر على نسخ الجين.

٣- تنظم كل من المعززات والسيلنسرز أعلى مستوى لنسخ الجين فى المكان المناسب والوقت المناسب وأنها يمكنها أن تقع على شمال أو يمين الجين على بعد مسافة تصل إلى ١٠٠٠٠ يوكليوتيدة من موقع بداية نسخ الجين وارتباط البروتينات المختلفة بمواقع ارتباطها داخل معزز ما أو بين معززات مختلفة وكذلك بالسيلنسرز يحدد نظام التعبير النهائى للجين ومستوى هذا التعبير.

دور البروتينات ميك Myc وماكس Max فى نسخ الجينThe roles of Myc and Max proteins in gene transcription

أوضحنا فيما سبق أن المعززات هى عبارة عن تتابعات من الـ DNA يرتبط بها البروتينات والتي إما أن تنشط أو تكبت نسخ جين ما ويعتمد ذلك على البروتين الذى يرتبط بالمعزز وكذلك التفاعل مع البروتينات الأخرى وأنه من الممكن لبروتين ما أن يرتبط بمعزز معين ويعمل كمنشط فى خلية ما ومكبت فى خلية أخرى وفيما يلى أمثلة على هذا النوع من البروتينات.



شكل (٤٦): يوضح آلية تنظيم التعبير الجيني عن طريق عنصر مستقبل هرمون الثيرويد (THRE) بالـ DNA

A- فى غياب كل من هرمون الثيرويد ومستقبله يحدث نسخ للجين A بمستوى منخفض.

B- فى وجود كل من هرمون الثيرويد ومستقبله يرتبطا معاً بالموقع THRE ويعمل هذا الموقع كمعزز (Enhancer) لنسخ الجين A ويزداد مستوى نسخ هذا الجين.

C- ارتباط مستقبل هرمون الثيرويد فقط بالموقع THRE وبالتالي يعمل هذا الموقع كسيلنسر (Silencer) لنسخ الجين A ولا يحدث له نسخ.

١- البروتين ميك (Thy Myc protein)

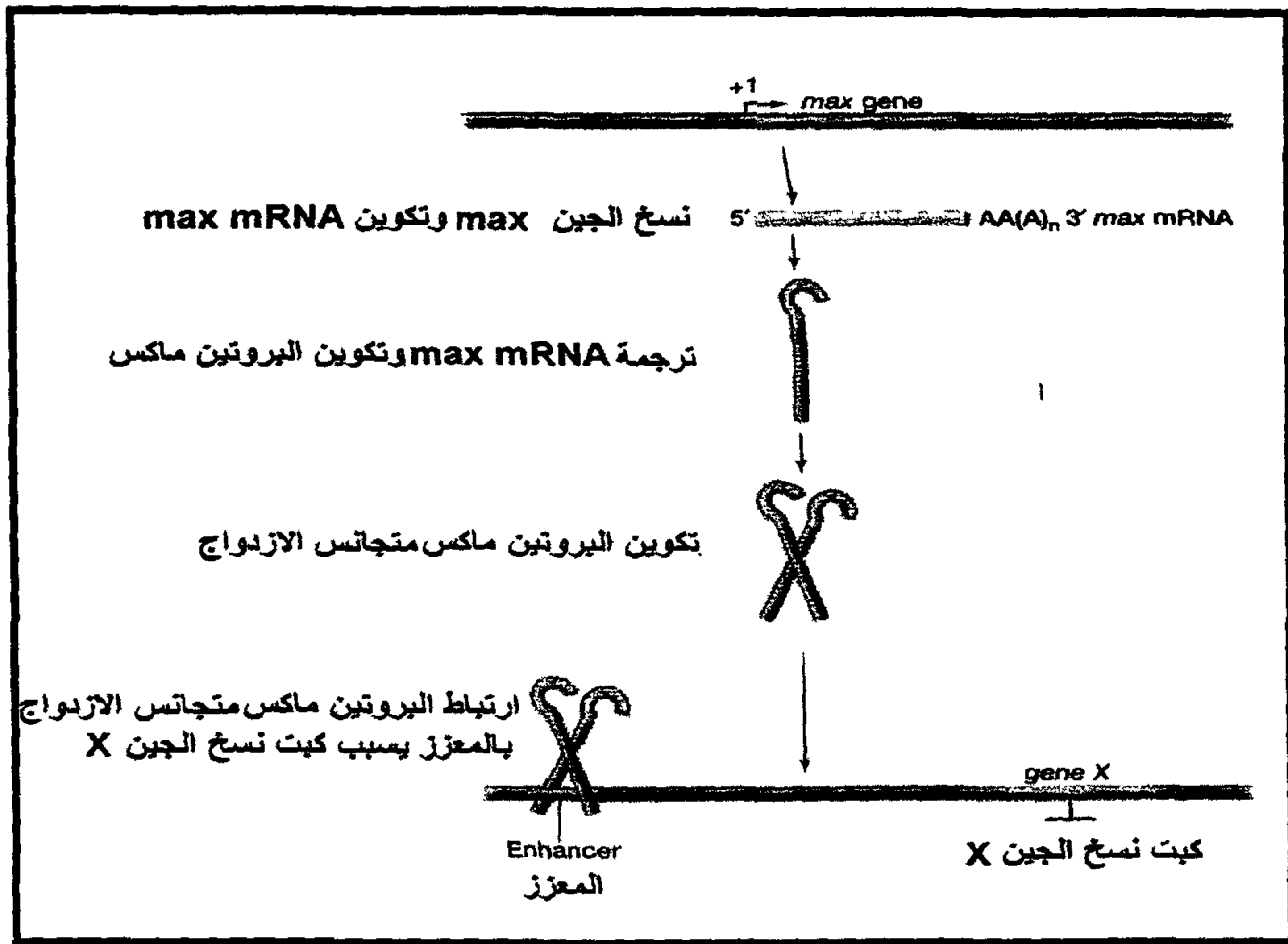
هذا البروتين (Myc) يرتبط بالـDNA ويسبب هذا الارتباط تنشيط نسخ الجينات التى تحمل شفرات البروتينات التى تحتاجها عملية الانقسام الخلوى. وعلى ذلك فإن هذا البروتين غالباً ما يتواجد فى الخلايا النشطة فى الانقسام الخلوى ولا يوجد فى الخلايا التى تشكلت وتوقفت عن الانقسام الخلوى. والجين (Myc) الذى يحمل شفرات هذا البروتين هو أيضاً بروتونكوجين (Proto-oncogene). والتعبير الخاطىء لهذا الجين فى الخلايا المتشكلة وإنتاجه للبروتين ميك يدفعها للانقسام الخلوى مرة أخرى بصورة نشطة انقسامات متتالية يترتب عليه تكوين الورم (Tumor). كذلك أوضحت الدراسات الفيزيائية على هذا البروتين أنه منشط للنسخ.

٢- البروتين ماكس (The Max protein)

البروتين ماكس ينقصه الجزء البروتينى الذى ينشط نسخ الجينات وقد يتواجد فى صورة متجانسة الإزدواج (Homodimer) أو فى صورة غير متجانسة الإزدواج (Heterodimer) عندما يرتبط بالبروتين ميك (Myc). وللبروتين ماكس قدرة كبيرة على التفاعل مع البروتين ميك وتكوين بروتين غير متجانس الإزدواج أكثر من تفاعله مع نفسه لتكوين بروتين ماكس متجانس الإزدواج. ونظراً لأن البروتين ماكس (Max) يتواجد فى كل الخلايا فى كل الأوقات فإنه عادة ما يتواجد فى صورة متجانسة الإزدواج يمكنه الارتباط بالمعزز. ونظراً لأنه ينقصه النشاط النسخى فإن ارتباط البروتين ماكس (Max) متجانس الإزدواج بالمعزز سوف يكبت (Represses) نسخ الجين (شكل ٤٧). وعندما يتواجد البروتين ميك (Myc) يفشل البروتين (Max) فى تكوين جزيئى متجانس الإزدواج ويفضل أن يصبح فى صورة غير متجانسة الإزدواج بارتباطه مع البروتين ميك (Myc) والذى يرتبط بالـDNA عند تتابع نيوكليوتيدى معين (المعزز Enhancers) فإنه ينشط نسخ الجين (شكل ٤٨). وعلى ذلك فإن البروتين ماكس عبارة عن وحدة بروتينية لها خاصية كل من الكابت والمنشط والتى ترتبط بنفس المعزز والفرق بينهما يرجع إلى ما إذا كان البروتين ماكس فى صورة متجانسة الإزدواج أو فى صورة غير متجانسة الإزدواج مع البروتين ميك. ويكون النظام ميك-

ماكس (Myc-Max) فعال وظيفياً في كبت نسخ الجين إذا كان البروتينين ماكس في صورة متجانسة الإزدواج (شكل ٤٧)

ويكون هذا النظام منشط لنسخ الجين إذا كان البروتينين ماكس والبروتين ميك في صورة غير متجانسة الإزدواج كما هو مبين في (شكل ٤٨). ونظراً لأن البروتينين ماكس (Max) يفضل أن يكون في صورة غير متجانسة الإزدواج مع البروتين ميك (Myc) فسوف يتناقص كبت نسخ الجين عندما يتواجد البروتين ميك Myc.

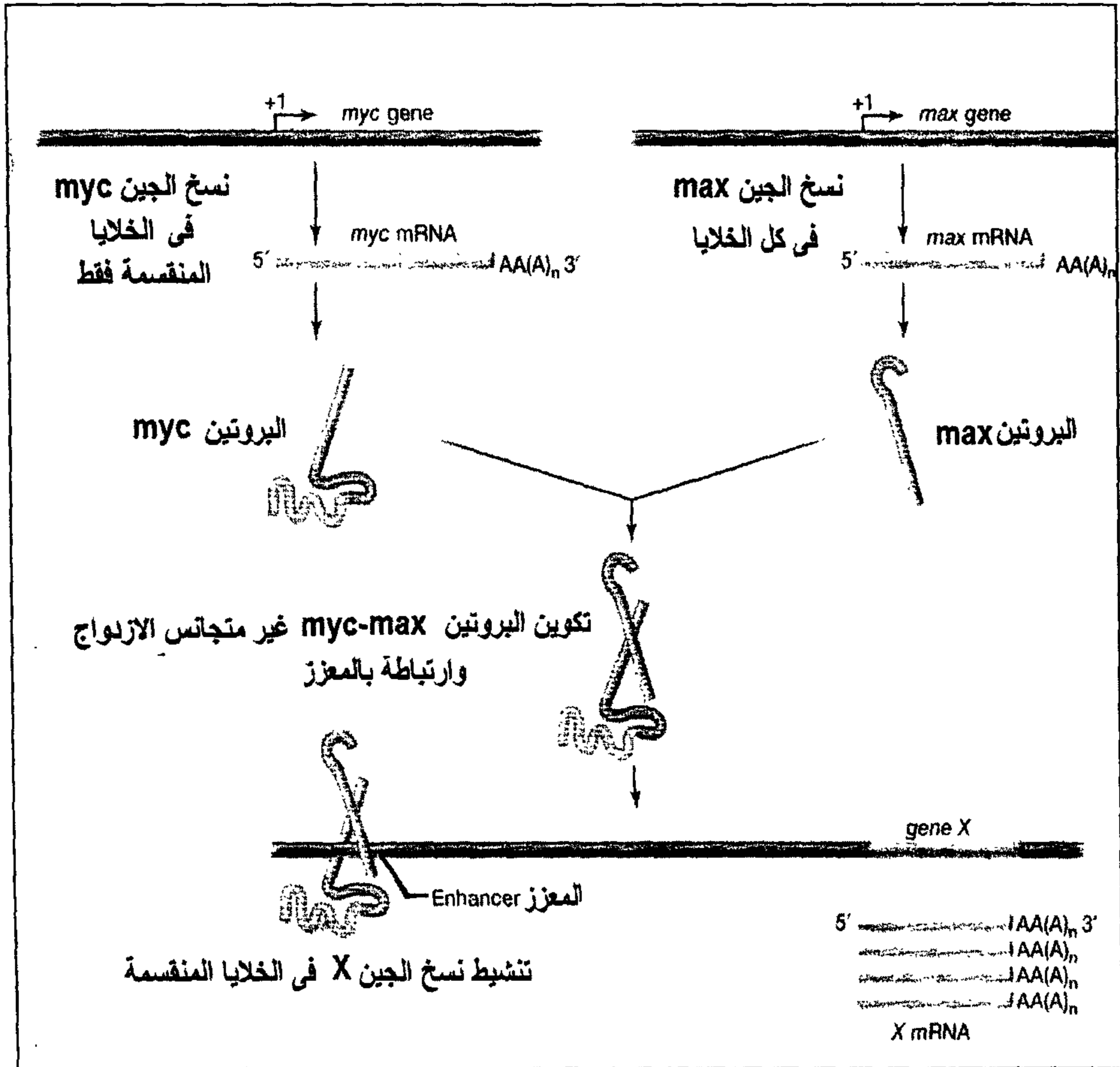


شكل (٤٧): يوضح نموذج كبت نسخ الجين بواسطة البروتينين Max المتجانس الإزدواج

A model for repressing gene transcription by the Max homodimer

يحدث نسخ للجين Max في كل الخلايا والذي يترجم إلى البروتين Max ثم بعد ذلك يتكون البروتين Max المتجانس الإزدواج (Max homodimer) والذي يرتبط بمعزز خاص (Specific enhancer) على الـ DNA وغلق (Blocks) نسخ عديد من الجينات وذلك لأن البروتين Max ينقصه الجزء الذي ينشط عملية النسخ.

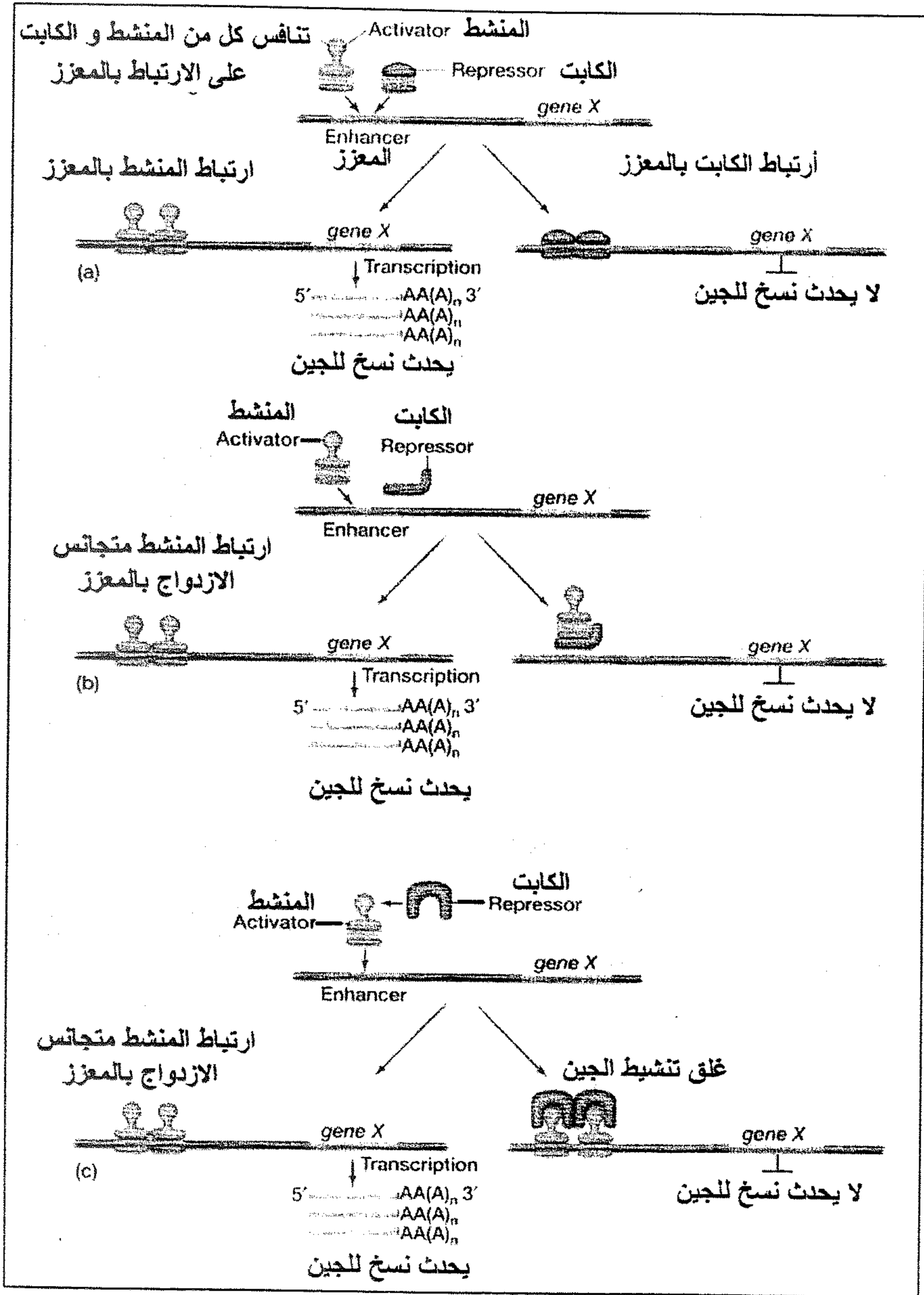
وغالباً ما تكون الكابتات (Repressors) فعالة وظيفياً من خلال آليتين واللتان تختلفان عن بعضهما طبقاً لذلك الجزء من البروتين الذى يرتبط بالمنشط وبالتالي يحجب بواسطة الكابت. وفى الآلية الأولى يرتبط الكابت بالبروتين المنشط والذى يترتب عليه حجب ارتباط المنشط بالـ DNA (شكل ٤٩) ومن ثم يصبح المنشط غير قادر على الارتباط بالمعزز كما هو الحال فى حالة الجزيء غير متجانس الإزدواج وفى الآلية الثانية يرتبط الكابت بالجزء التنشيطى من المنشط ولكن هذا الارتباط بينهما لا يفقد المنشط القدرة على الارتباط بالمعزز ولكنه لا يستطيع تنشيط نسخ الجين (شكل ٤٩). ومقدرة ارتباط البروتينات مع الـ DNA لتكوين وحدات مزدوجة (Dimmer) يسمح بوجود مستوى آخر من تنظيم التعبير الجينى والمعروف باسم النظام التنافسى بين تكوين جزيئات متجانسة الإزدواج أو جزيئات غير متجانسة الإزدواج.



شكل (٤٨): يوضح نموذج تنشيط نسخ الجين بواسطة البروتين Max-Myc غير متجانس الأزواج

Model for activating gene transcription by the Max-Myc heterodimer

يحدث تعبير لكل من الجين Myc والبروتين Myc الناتج منه فقط في الخلايا التي تنقسم بينما يحدث تعبير للجين max والبروتين Max الناتج منه في كل الخلايا وبالتالي يتكون البروتين غير متجانس الأزواج (Myc-Max heterodimer) في الخلايا المنقسمة والذي يرتبط بمعزز ما وبالتالي ينشط عملية نسخ الجينات الهدف. ومعظم هذه الجينات الهدف يكون لها دور في عملية الانقسام الخلوي.



شكل (٤٩): يوضح تنظيم التعبير الجيني من خلال آليات تنافس كل من البروتين المنشط (Activator) والبروتين المكبت (Repressor) على الارتباط بنفس المعزز (Enhancer)

شرح شكل (٤٩)

- a- ارتباط المنشط بالمعزز ينشط نسخ الجين X بينما ارتباط المكبت بنفس المعزز يكبت نسخ الجين.
- b- ارتباط الكابت بالمنشط يتكون مركب غير متجانس الإزدواج (Heterodimer) لا يستطيع الارتباط بالمعزز وبالتالي لا يحدث نسخ للجين X ومن ناحية أخرى يستطيع المنشط متجانس الإزدواج تنشيط نسخ الجين X بارتباطه بالمعزز.
- c- ارتباط المنشط بالمعزز ثم ارتباط الكابت بالمنشط الذى ينشط النسخ وبذلك يحدث غلق لنسخ الجين X بينما يستطيع المنشط متجانس الإزدواج الارتباط بنفس المعزز لتنشيط نسخ الجين X.

دور الكروماتين فى تنظيم التعبير الجينىThe Role of Chromatin in Regulation of Gene Transcription

ناقشنا من قبل ارتباط الطرز المختلفة من البروتينات بالتتابعات النيوكليوتيدية المختلفة من الـ DNA لتنظيم نسخ الجين. ومع ذلك فإنه لى ترتبط البروتينات بالـ DNA الجينومى فإنه يجب أن يكون متاحاً أو سهل المنال لهذه المنشطات أو المكبتات وبالمثل إتاحة الفرصة لإنزيم البلمرة (pol II) والبروتينات الموجودة فى مركب بداية النسخ (TF_{II}D) للتعرف على البروموتور الموجود فى الـ DNA الجينومى.

ومن المعروف أن الـ DNA الجينومى فى الكائنات حقيقية النواة يتواجد فى صورة كروماتين (Chromatin) والذى هو عبارة عن المركب المكون من الـ DNA وعديد من أنواع البروتينات. والارتباط الشديد بين الـ DNA الجينومى مع البروتينات وخاصة بروتينات الهستون فى صورة نيكليوسوم (Nucleosome) يعتبر هذا الارتباط هو العامل الرئيسى فى كبت نسخ الجين. وعلى ذلك فإن ابتداء النسخ يحتاج إلى تحويل الكروماتين لى يصبح الـ DNA الجينومى سهل المنال من آلة النسخ. ويوجد عديد من الآليات التى يمكنها أن تحور النيوكليوسوم والذى ينتج عنه إعادة شكل الكروماتين (Chromatin) وهى:

١ - إضافة وإزالة مجاميع الاسيتايل الى ومن بروتين الهستون

1- Histone Acetylation and Deacetylation

فى الكائنات حقيقية النواة يتركب النيوكليوسوم من نسختين من كل من بروتينات الهستون الأربعة وهى البروتينات H4, H3, H2B, H2A وبروتين الهستون الخامس (H1) يرتبط بالـ DNA الرابط (Linker DNA) والذي يقع بين النيوكليوسومات . ونظراً لأن هذه الهستونات تقوم بنفس الوظيفة فى كل الكائنات حقيقية النواة فإن دورها فى تنظيم التعبير الجينى يجب أن يكون محفوظاً فى كل الكائنات حقيقية النواة.

وقد تتواجد الهستونات فى صورة هستونات مضاف إليها مجاميع الاسيتايل أو فى صورة هستونات لا تحتوى على مجاميع الاسيتايل وتضاف مجاميع الاسيتايل إلى الأحماض الأمينية الليسين (Lysines) الطرفية فى الهستونات H4, H3 ومن ثم فإن الهستونات المضاف إليها مجاميع الاسيتايل تكون مرتبطة بالجينات التى تتسخ بينما الهستونات المزال منها مجاميع الاسيتايل توجد بالقرب من الجينات التى تكبت (Repressed) من حيث النسخ.

ويتم إضافة مجاميع الاسيتايل بواسطة مجموعة من الإنزيمات تسمى Histone acetyltransferases (HATs) حيث تقوم بإضافة مجاميع الاسيتايل إلى بروتينات الهستون H4, H3 التى تم تخليقها جديداً ثم بعد ذلك تصدر هذه الهستونات إلى النواة لتدخل فى النيوكليوسومات (Nucleosomes).

ومن المشوق والمثير أن نلاحظ أن الوحدة البروتينية (TAFII 250) التى تدخل فى تركيب مركب بداية النسخ (TFIID) والتى ترتبط بمنطقة البداية (InR) من البروموتور (Promoter) أثناء تكوين مركب بداية النسخ الأولى لها القدرة أيضاً على الارتباط بالأحماض الأمينية الليسين (Lysines) المضاف إليها مجاميع الاسيتايل وعلى ذلك فإنه من الممكن أن تتعرف الوحدة البروتينية (TAFII250) على مناطق البداية المرتبط بها بروتينات الهستون المضاف إليها مجاميع

الاسيتايل وارتباط الوحدة البروتينية (TAFII250) أيضاً يسبب إضافة مجاميع الاسيتايل إلى بروتينات الهستونات القريبة لجعل الـDNA أكثر إتاحة لبداية النسخ.

وتحتوى الخلايا أيضاً على إنزيمات إزالة مجاميع الاسيتايل من بروتينات الهستون وهى Histone deacetylase (HDALs) والتي تختزل عدد مجاميع الاسيتايل الموجودة فى بروتينات الهستون H4, H3. وهذه الإنزيمات (HDALs) ضرورية لاختزال مستويات إضافة مجاميع الاسيتايل والتي تحتاجها عملية كبت النسخ.

ولقد أوضحت الأدلة والبراهين الحديثة أن البروتينات التى ترتبط بالـDNA تتعرف على تتابع معين من الـDNA وليس ذلك فقط بل أنها أيضاً تتعرف على حالة بروتينات الهستون المضاف إليها مجاميع الاسيتايل ومن ثم فإنها تسبب زيادة إتاحة الـDNA إلى المنشطات الأخرى وكذلك لإنزيم البلمرة (pol II). وبالمثل فإن ارتباط كابت ما بالـDNA سوف يطوع إنزيمات (HDALs) والتي تختزل إضافة مجاميع الاسيتايل إلى بروتينات الهستون بمزيد من كبت النسخ عن طريق جعل الـDNA أقل إتاحة للنسخ.

٢- إضافة مجاميع الميثايل إلى الهستون Histone Methylation 2-

إضافة مجاميع الاسيتايل إلى بروتينات الهستون ليست هى التحور الوحيد الذى يحدث لبروتينات الهستون حيث أنه وجد أن كل من الأحماض الأمينية الليسين (lysines) والارجنين (Arginines) الموجوده فى البروتينات الهستونية الأربعة (H2A, H2B, H4, H3) يمكن أن يحدث إضافة لمجاميع الميثايل (Methylations) لهذه الأحماض الأمينية بواسطة إنزيم Histone methyltransferase (HMTase) وبينما إضافة مجاميع الاسيتايل تُسبب تنشيط النسخ فقط فإن إضافة مجاميع الميثايل (Methylation) لبروتينات الهستون يمكنه أن ينشط أو يكبت النسخ (شكل ٥٠) ويمكن تلخيص ما سبق ذكره فى النقاط التالية:

١- إعادة شكل الكروماتين هو تغير فى موقع النيوكليوسوم أو التفاعل بين النيوكليوسوم والذى تتطلبه عملية كبت (Repression) أو تنشيط (Activation) نسخ الجين.

٢- يتحكم فى مستوى إضافة مجاميع الاسيتايل (Acetylation) لبروتينات الهستون إنزيمات إضافة وإزالة مجاميع الاسيتايل HDALs, HATs على الترتيب. وعموماً فإن زيادة إضافة مجاميع الاسيتايل مرتبط بتنشيط النسخ.

٣- إضافة مجموعة الميثايل لبروتينات الهستون يمكنه أن ينشط أو يكبت النسخ. وتوجد شبكة معقدة من التنظيم والتي فيها يؤثر نظام إضافة مجاميع الاسيتايل على إضافة مجموعة الميثايل إلى بروتينات الهستون وان إضافة الميثايل تؤثر على إضافة مجاميع الاسيتايل. هذه الحالة المعقدة تسمح بتنظيم النسخ لبعض الجينات.

٤- يوجد طرز مختلفة من الهستونات والتي يمكنها أن تدخل فى النيوكليوسومات لتغيير حالة الكروماتين. وفى بعض الحالات فإن بروتينات إعادة شكل الكروماتين تتطلب إعادة وضع هستون مختلف داخل النيوكليوسوم.

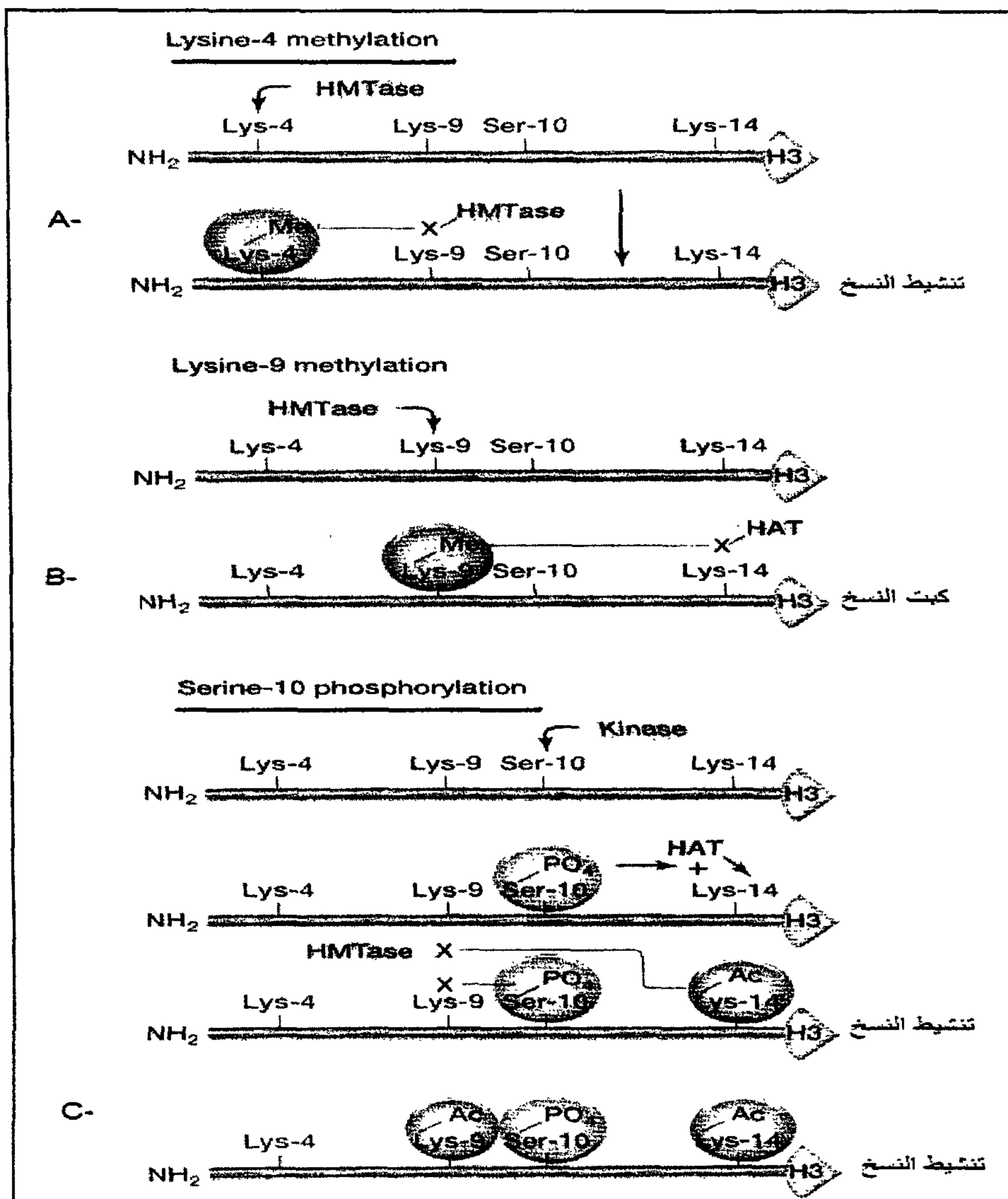
3-Methylation of DNA

٣-إضافة مجاميع الميثايل للـDNA

تلعب إضافة مجاميع الميثايل للـ DNA دوراً هاماً فى التفاعل بين البروتينات والـDNA. وفيما سبق ناقشنا دور إضافة مجموعة الميثايل إلى بروتينات الهستون والتي يمكنها أن تكبت نسخ بعض الجينات وفيما يلى سوف نتناول إضافة مجاميع الميثايل للـDNA والتي يمكنها أن تكبت أيضاً النسخ مؤدياً ذلك إلى سكوت الجين (Gene silencing).

فى الكائنات حقيقية النواة يحدث إضافة مجموعة الميثايل للقاعدة سيتوسين (Cytosine) بواسطة إنزيم DNA methylase بنسبة بسيطة. ومعظم قواعد السيتوسين (C) التى يحدث لها إضافة بمجموعة الميثايل تكون تلك المجاورة للقاعدة جوانين Guanine (G) فى نفس خيط الـDNA (CpG). وفى الإنسان تصل نسبة السيتوسين (C) المضاف إليه مجموعة الميثايل إلى ٨٠% من التتابع النيوكليوتيدى (CpG) والذي قد يصل ما بين ١٠٠٠ إلى ٢٠٠٠ نيوكليوتيدة بالتتابع (CpG) والتي تقع على بعد عديد من مئات أزواج القواعد على شمال بداية نسخ الجين إلى عديد من مئات أزواج القواعد على يمين الجين. وعلى ذلك فإن عديد من التتابعات (CpG) فى

نفس خيط الـ DNA تقع بالقرب من بروتينات (Promoters) جينات الكائنات حقيقية النواة وهذا الموقع لهذه التتابعات (CpG) يعتبر موقع نموذجي لتنظيم النسخ (شكل ٥١) .



شكل (٥٠): تنشيط أو كبت النسخ بإضافة مجموعة الميثايل أو الفسفرة لبعض الأحماض الأمينية في بروتين الهستون.

شرح شكل (٥٠)

A- إضافة مجموعة الميثايل للحامض الأمينى الليسين رقم ٤ بواسطة إنزيم Histon methyltransferase (HMTase) يخلق إضافة مجموعة الميثايل لليسين رقم ٩ وبالتالي يحدث تنشيط للنسخ

B- إضافة مجموعة الميثايل لليسين رقم ٩ يخلق إضافة مجموعة الميثايل لليسين رقم ١٤ وبالتالي يحدث كبت للنسخ

C- فسفرة الحامض الأمينى السيرين رقم ١٠ ينشط إضافة مجموعة الاسيتايل لليسين رقم ١٤ والذي يؤدي بدوره إلى غلق إضافة مجموعة الميثايل لليسين رقم ٩ وبالتالي يحدث تنشيط للنسخ وكذلك فسفرة السيرين رقم ١٠ ينشط إضافة مجاميع الاسيتايل لكل من الليسين رقم ٩ والليسين رقم ١٤ ومن ثم يحدث تنشيط للنسخ

بالتتابع (CpG) والتي تقع على بعد عديد من مئات أزواج القواعد على شمال بداية نسخ الجين إلى عديد من مئات أزواج القواعد على يمين الجين. وعلى ذلك فإن عديد من التتابعات (CpG) فى نفس خيط الـ DNA تقع بالقرب من بروموتورات (Promoters) جينات الكائنات حقيقية النواة وهذا الموقع لهذه التتابعات (CpG) يعتبر موقع نموذجى لتنظيم النسخ (شكل ٥١) .

وتتلائم درجة إضافة مجموعة الميثايل للـ DNA مع درجة سكون جين ما. وفى الجينات المعروفة باسم الجينات المدبره (Housekeeping genes) والتي تنتج البروتينات فى كل الخلايا وفى كل الأوقات فى الكائنات متعددة الخلايا وجد أن إضافة الميثايل إلى السيتوسين فى التتابع (CpG) يكون عند أدنى مستوى له. وعلى العكس من ذلك فإن الجينات التى لا تبدى تعبيرها فى خلايا خاصة أو نسيج خاص تحتوى على درجة عالية من إضافة مجموعة الميثايل للسيتوسين فى التتابع (CpG) وعلى ذلك فإن إضافة مجموعة الميثايل للـ DNA لها دور فى سكون النسخ (Silencing transcription) والمثال الواضح على سكون النسخ هو وجود أحد كروموسومى X بصورة غير نشطة فى أى خلية جسمية لإناث الثدييات وتحليل هذا الكروموسوم (X) غير النشط أتضح أنه يحتوى على درجة عالية من إضافة مجموعة الميثايل لقواعد السيتوسين فى التتابع (CpG) عن كروموسوم (X) الآخر النشط..

وتوجد آلية أخرى تتضمن تحديد وتعيين البروتينات التي ترتبط بالـ DNA المضاف إليه مجاميع الميثايل (Methylated DNA). هذه البروتينات التي ترتبط بخيط الـ DNA المضاف إليه مجاميع الميثايل في التتابع النيوكليوتيدى (CpG) والمعروفه باسم Methyl-CG-binding proteins تتعرف على السيتوسين المضاف إليه مجموعة الميثايل بغض النظر عن التتابع النيوكليوتيدى المجاور (شكل ٥١). وعلى ذلك فإنه من الممكن لهذه البروتينات التي ترتبط بالـ DNA تعزيز الارتباط بإنزيمات إزالة مجاميع الاسيتايل من بروتينات الهستون (HDALs) والذي يؤدي إلى مزيد من كبت النسخ عن طريق إعادة شكل الكروماتين. ومن الواضح أن إضافة مجاميع الميثايل للـ DNA (DNA methylation) إلى القاعدة سيتوسين (C) في التتابع (CpG) تحدث في جميع الكائنات. وهذه العملية تكبت نسخ الجينات عن طريق منع المنشطات من الارتباط بتتابع معين من الـ DNA وكذلك بارتباط البروتينات بالتتابعات (CpG) التي تحتوى على مجموعة ميثايل بالقاعدة سيتوسين (C) والتي تطوع إنزيمات إزالة مجاميع الاسيتايل (HDALs) من بروتينات الهستون H3, H4 وبالتالي لا يحدث نسخ للجين (شكل ٥١).

ثانياً : تنظيم التعبير الجيني عند مستوى ما بعد النسخ

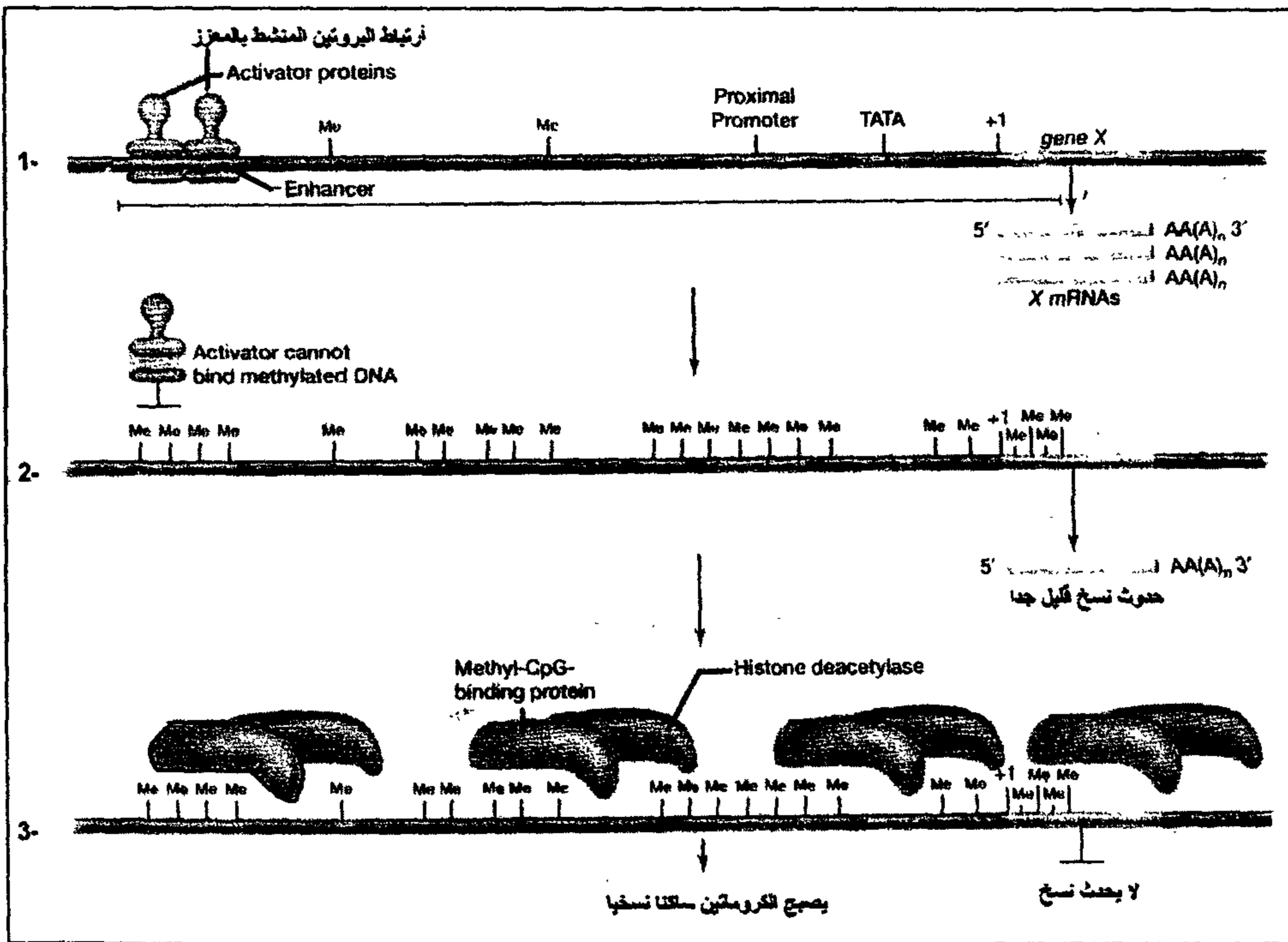
Posttranscriptional level regulation

يقصد بتنظيم التعبير الجيني لجين ما عند مستوى ما بعد النسخ هي تلك الآليات التي تحدث وتسبب تعطيل ترجمة جزيء الـ mRNA إلى البروتين المناسب ومنها ما يلي:

١ - الـ RNA الدقيق (miRNAs) Micro RNAs

هذا النوع من الـ RNA (miRNAs) ينظم التعبير الجيني لجين ما عن طريق تعطيل ترجمة الـ mRNA إلى البروتين المناسب إما عن طريق تكسير الـ mRNA المناظر أو عن طريق اقتران أزواج القواعد بين الـ miRNA والـ mRNA وغلق ترجمة الـ mRNA إلى البروتين. فإذا كان الـ miRNA يحمل القواعد المكملة لتلك الموجودة في الـ mRNA فإنه يحدث للـ mRNA كسر عند موقع خاص. وهذا الكسر يمنع ترجمة الـ mRNA إلى البروتين المناسب

وعلى العكس من ذلك إذا وجد عدد محدد من الاقتران الخاطئ بين الـ mRNA والـ miRNA فإن المنطقة المزبوجة الخيط الناتجة عن الاقتران تغلق الترجمة بدون حدوث كسر للـ mRNA وحدث أى من الحدثين ينتج عنه انخفاض فى كمية البروتين الناتجة من ترجمة الـ mRNA الناتج من هذا الجين. ومثل هذا التنظيم فى التعبير الجينى عند هذا المستوى يعرف بالتنظيم الجينى ما بعد نسخ الجين (Posttranscriptional regulation).



شكل (٥١): يوضح نماذج كبت النسخ بإضافة مجاميع الميثايل للـ DNA

- ١- ارتباط البروتين المنشط بمعزز ما لينشط نسخ الجين X
- ٢- إضافة مجاميع الميثايل (Me) إلى التتابع النيوكليوتيدى CpG المتعدد يمنع ارتباط المنشط بالمعزز ويحدث نسخ قليل للجين X.
- ٣- ارتباط البروتين بالتتابعات CpG المضاف إليها مجاميع الميثايل يطوع إنزيم إزالة مجاميع الاسيتايل من الهستون وبالتالي يحدث إزالة لمجاميع الاسيتايل من الهستونات H₃ و H₄ ويصبح الكروماتين ساكن نسخياً ولا يحدث نسخ للجين X.

٢- الـ RNA مضاد المعنى Antisense RNA

القسم الآخر من الـ RNA الذى يلعب دوراً في تنظيم التعبير الجيني ما بعد النسخ يسمى بالـ RNA مضاد المعنى والذى ينظم أيضاً ترجمة الـ mRNA إلى البروتين المناسب. ويحمل هذا النوع من الـ RNA المضاد المعنى (Antisense RNA) بعض التتابع النيوكليوتيدى المكمل للـ mRNA الهدف ويقترن به والذى يترتب عليه أحد النتائج التالية (شكل ٥٢):

١. أن هذا الاقتران بين أزواج القواعد المكملة بين هذا الـ RNA المضاد المعنى والطرف 5' من الـ mRNA المعين يغلق ترجمة الـ mRNA إلى البروتين المناسب.

٢. إذا حدث الاقتران متضمناً كل من الاكزون (Exon) والانترون (Intron) يؤدي ذلك إلى غلق تحويل المنسخ الأولي (hnRNA) إلى جزيء الـ mRNA الناضج والذى سوف يذهب إلى السيتوبلازم لترجمته إلى البروتين المناسب.

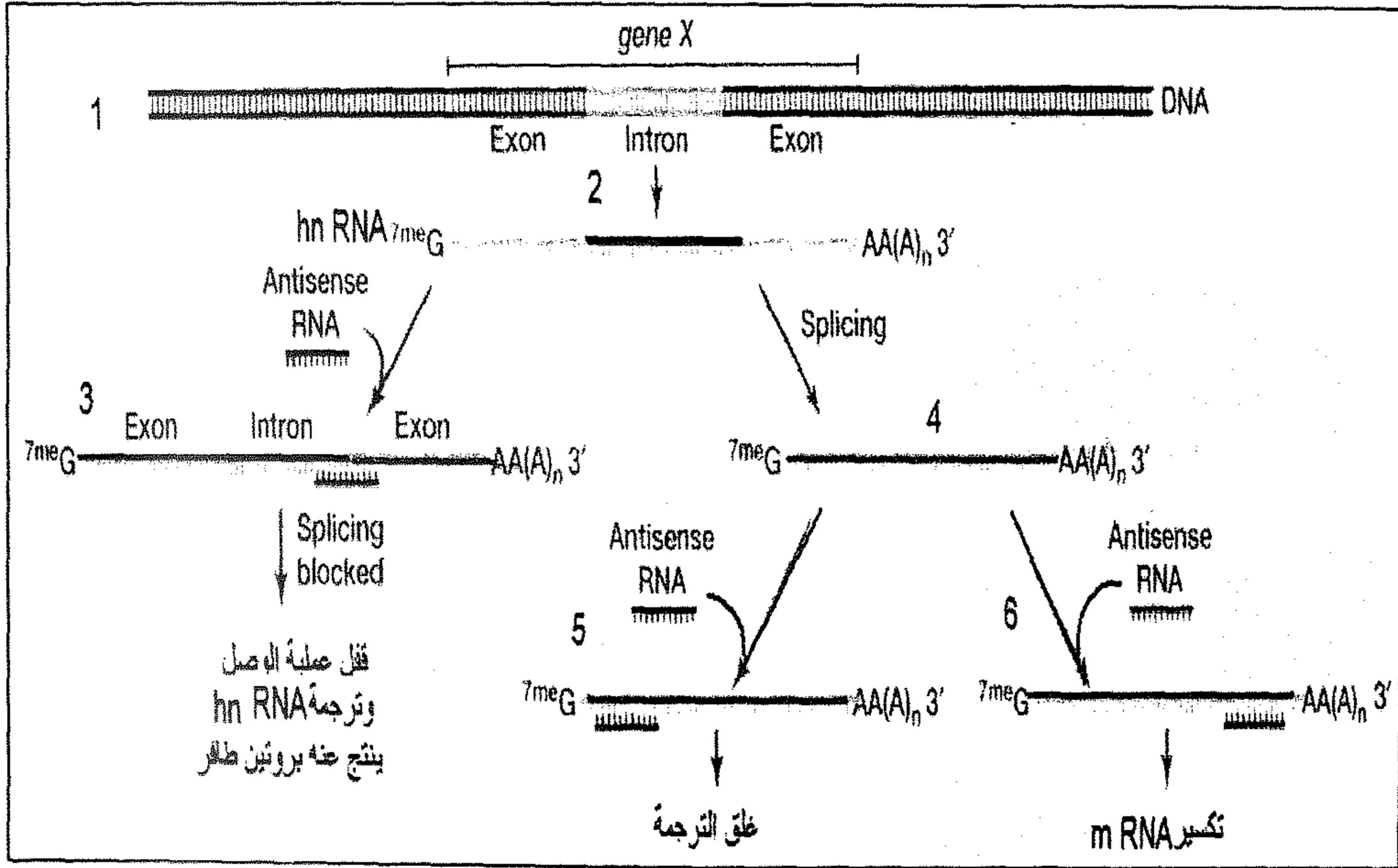
٣. أن الاقتران بين الـ RNA مضاد المعنى والطرف 3' من الـ mRNA الناضج يؤثر على ثبات الـ mRNA وينتج عن ذلك تكسيره.

وهذا النظام من تنظيم التعبير الجيني هو أيضاً مثال لتنظيم التعبير الجيني ما بعد النسخ.

٣- البروتينات التى ترتبط بالمناطق التى لا تترجم من الـ mRNA فى الطرف 3'

Proteins Binding to 3' Untranslated Regions (3'UTR)

أحد آليات تنظيم التعبير الجيني ما بعد النسخ تتضمن ارتباط بروتين ما بالـ mRNA لتبدي تأثيرها. وبالرغم من أننا ناقشنا عديد من البروتينات التى ترتبط بالـ DNA فإنه يوجد أيضاً قسم من البروتينات والتى تتعرف بطريقة خاصة على الـ mRNA وترتبط به وغالباً ما ترتبط هذه البروتينات بالطرف 3' من الـ mRNA الذى لا يترجم (3'UTR) وتحويره وكبت (Repress) ترجمته.



شكل (٥٢): يوضح آلية تفاعل الـ RNA مضاد المعنى فى الخلية

Mechanism of antisense RNA action in a cell

١- الـ DNA الجينومى الذى يحتوى على الجين (X) الذى يتركب من اكترونين (2 Exons) ويقع بينهما انترون واحد (Intron).

٢- نسخ هذا الجين وتكوين المنسخ الاولى hnRNA.

٣- ارتباط الـ Antisense-RNA بالـ hnRNA فى المنطقة بين الأنترون والأكترون الثانى عن طريق الاقتران بين أزواج القواعد المكملة وبالتالي يغلق تحويله (Splicing) إلى الـ mRNA الناضج ومن ثم فإن ترجمة الـ hnRNA ينتج عنها بروتين طافر.

٤- حدوث عملية الوصل للـ hnRNA بإزالة الانترونات وتجميع الاكترونات وتكوين الـ mRNA الناضج.

٥- ارتباط الـ Antisense RNA بالطرف 5' من الـ mRNA وبذلك يغلق ترجمته.

٦- ارتباط الـ Antisense RNA بالطرف 3' poly A وبذلك يصبح الـ mRNA غير ثابت ويحدث له تكسير.

Alternative Splicing

٤- الوصل البديل

أحد الآليات الأخرى لتنظيم التعبير الجيني ما بعد النسخ هى الوصل البديل للمنسخ الأولى (hnRNA) لإنتاج عديد من الـ mRNA وهذا الوصل البديل يستعمل الاكزونات (Exons) المتنوعة لإنتاج جزيئات مختلفة من الـ mRNA من نفس المنسخ الأولى (hnRNA) . وأحد نتائج الوصل البديل هو القدرة على إنتاج بروتينات مختلفة من نفس الجين وهذا الوصل البديل شائع فى الإنسان لدرجة أن نصف جينات الإنسان يحدث فيها الوصل البديل بمتوسط ثلاثة أنواع مختلفة من الـ mRNA لكل جين من هذه الجينات.

٥- افساد الـ mRNA

Nonsense-mediated mRNA decay (NMD)

حديثاً أمكن تحديد طريقة جديدة لتنظيم ثبات الـ mRNA وتعرف باسم Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) وتعمل هذه الطريقة فى عديد من أنواع الـ mRNAs بما فيها جزيئات الـ mRNAs الناتجة من نسخ الجين الطافر وكذلك جزيئات الـ mRNA التى حدثت بها طفرة أثناء النسخ وأيضاً جزيئات الـ mRNA التى حدث لها وصل (Splicing) خاطئ. وبالإضافة إلى ذلك فإن هذه الطريقة (NMD) تستخدم فى تنظيم تواجد غير الطرز الطافرة من جزيئات الـ mRNAs بوفرة. والآلية التى يحدث بها افساد جزيئات الـ mRNAs تكون من خلال ثلاثة ممرات مختلفة:

١- إزالة الطرف 5' cap من الـ mRNA وتكسير الـ mRNA فى الاتجاه 3' → 5' بواسطة إنزيمات الـ Exonucleases.

٢- إزالة الذيل Poly A بالطرف 3' من الـ mRNA ثم بعد ذلك تكسيه فى الاتجاه 5' → 3'.

٣- كسر mRNA بالقرب من موقع شفرة إنتهاء الترجمة المبكرة (PTC) ويترتب على ذلك تحويله إلى قطعتين واللذان يحدث لهما تكسير فى الإتجاه $5' \rightarrow 3'$ تجاه الطرف (5' cap) وفى الإتجاه $3' \rightarrow 5'$ تجاه الذيل (Poly A tail) فى الطرف $3'$

وتلعب طريقة NMD دوراً هاماً فى تكسير جزيئات mRNA التى تحمل طفرات تنتج بروتينات تبدى شكلاً مظهرياً سائداً كما تلعب دوراً هاماً أيضاً فى تنظيم تعبير جزيئات mRNA غير الطافرة كما تستخدم كذلك لتنظيم المستويات الصحيحة من التعبير الجينى الطبيعى فى الثدييات فضلاً عن أنها تعتبر عملية أساسية فى تنظيم التعبير الجينى الطبيعى فى الثدييات. ويمكن تلخيص ما سبق فى النقاط التالية:

١. يوجد عديد من الآليات (Mechanisms) المختلفة التى تستخدم لتنظيم التعبير الجينى ما بعد النسخ تشمل استخدام الـ miRNA فى كبت (Repression) الترجمة .

٢. يمكن للبروتينات التى ترتبط بالـ mRNA تنظيم تعبيره بإزالة الذيل (Poly A tail) مما يؤدي إلى اختزال كفاءة الترجمة وثبات الـ mRNA.

٣. الوصل البديل (Alternative splicing) للمنسخ الأولى (hnRNA) يؤدي إلى تكوين جزيئات مختلفة من الـ mRNA والتى تنتج بروتينات مختلفة وعلى ذلك فإن تنظيم إنتاج جزيئات مختلفة من الـ mRNA من نفس الجين ينظم تعبير الطرز المختلفة من البروتين.

٤. طريقة افساد الـ mRNA (NMD) هى العملية التى يتم من خلالها تنظيم تعبير الجين فى كل جزيئات الـ mRNAs الناتجة عن الوصل البديل وجزيئات الـ mRNAs الطافرة والتى تحتوى على شفرة إنهاء الترجمة المبكرة (PTC) وينتج عن طريقة الـ NMD تكسير الـ mRNA من الطرف $5'$ وكذلك من الطرف $3'$ أو حدوث كسر داخل الـ mRNA.

ثالثاً : تنظيم التعبير الجيني عند مستوى الترجمةTranslational level regulation

إذا أخذنا فى الاعتبار آليات تنظيم التعبير الجيني فإنه من المهم أن نتذكر ان كل آليات التحكم كانت موجهة نحو أظهار تأثيرها على كمية ناتج الجين أو نشاط ناتج الجين. وعند هذه النقطة كان تركيزنا على الآليات التى تتحكم فى كمية mRNA والتى تعتبر أكثر الخطوات أهمية فى تنظيم التعبير الجيني وذلك لأنها هى أول خطوة فى التعبير الجيني. فإذا أمكن التحكم فى هذه الخطوة تماماً فإن الخلية لا تفقد طاقتها فى نسخ وترجمة الجينات التى تنتج بعض البروتينات التى لا تحتاجها الخلية فى وقت ما فضلاً عن فقد طاقتها فى تحويل هذا البروتين الناتج إلى الصورة الفعالة وظيفياً. وعلى ذلك فإنه يقصد بتنظيم التعبير الجيني عند مستوى الترجمة هى تلك الآليات التى تمنع ترجمة جزيئات mRNA رغم تواجدها ومنها ما يلى:-

١- عملية الفسفرة (Phosphorylation)

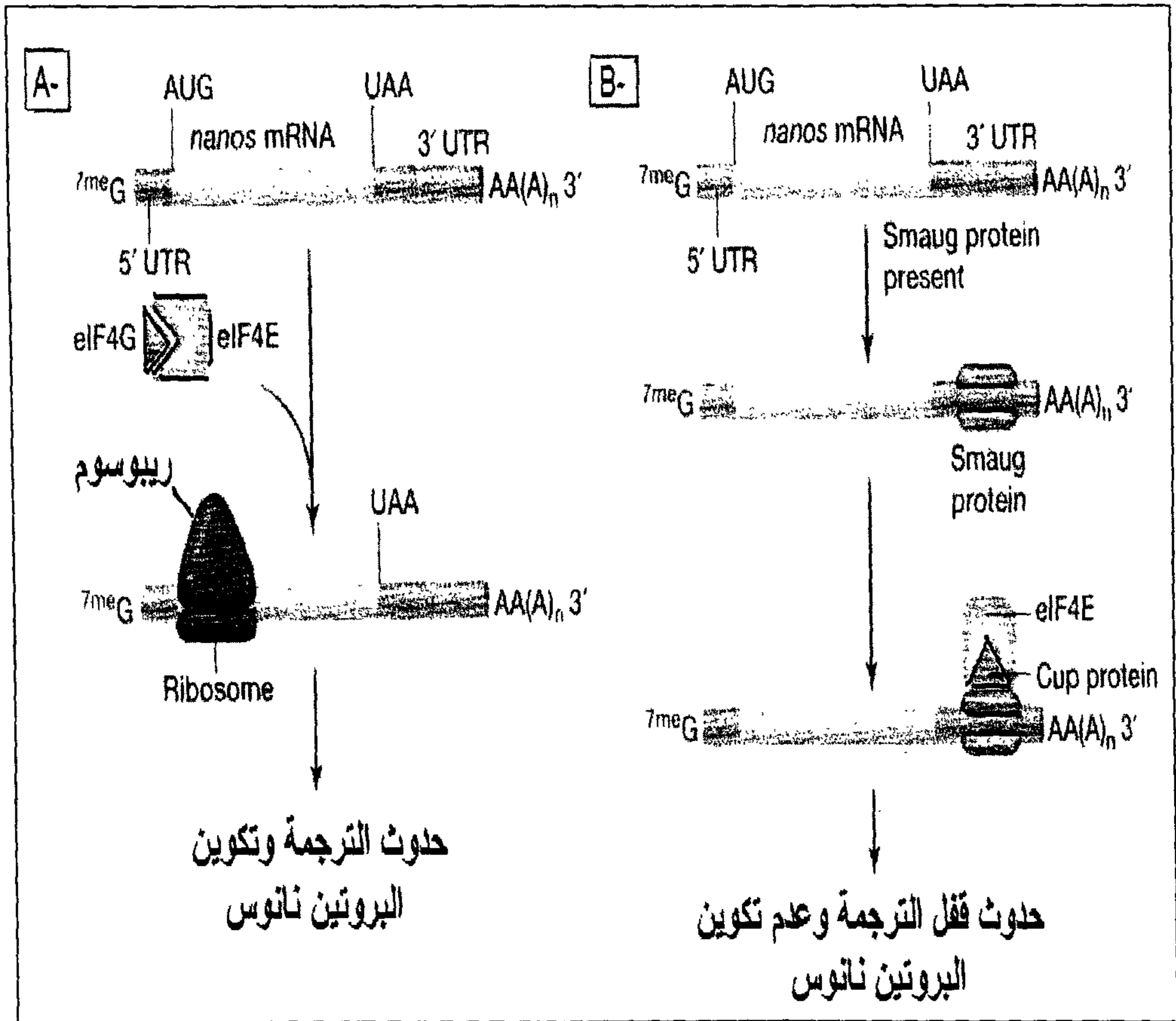
يمكن تنظيم الترجمة بسلوك عام عن طريق تحويل عوامل بداية الترجمة. ومما سبق ناقشنا كيف يؤدي تحويل البروتينات الهستونية وإضافة مجاميع الميثايل للـDNA فى التأثير على نسخ الجين. وبنفس الطريقة فإن إضافة مجاميع الفوسفات (Phosphorylation) لعامل بداية الترجمة (eIF2) Initiator factors2 فى الكائنات حقيقية النواة سوف يؤثر على آلية الترجمة بصفة عامة.

وعملية فسفرة عامل بداية الترجمة (eIF2) تمنع أول حامض نووى ناقل الذى يحمل الحامض الأميني ميثونين (Met-tRNA) من الارتباط بالوحدة الريبوسومية الصغيرة (40S). ونظراً لأن هذا التحور يكون موجهاً لكل جزيئات بداية الترجمة (eIF2) فسوف يكون له تأثير عام على الترجمة عن طريق غلق ترجمة كل جزيئات الـmRNAs إلى البروتين المناسب. وهذه الآلية تعمل كآلية عامة لتنظيم التعبير الجيني عند مستوى الترجمة.

٢ - تنظيم الترجمة عن طريق البروتين نانوس

Regulation of Translation by Nanos Protein

يمكن تنظيم ترجمة جزيئات معينة من mRNAs إلى البروتين المناسب. فعلى سبيل المثال فإن تنظيم تكوين البروتين نانوس يحدث عند مستوى الترجمة ففي إناث حشرة الدروسوفيلا يحدث نسخ للـ Nanos mRNA وتودع في خلية البيضة (Egg) قبل حدوث الاخصاب. وتتجمع هذه الجزيئات من الـ Nanos mRNA في الجزء الخلفى من البيضة حيث يحدث له ترجمة مبكرة في مرحلة النمو الجنينى. ووجود الـ Nanos mRNA في هذا الموقع الخلفى من البيضة يسمح لها بالتفاعل مع طرازين آخرين من البروتينات التى تنظم الترجمة إلى البروتين نانوس (Nanos). أحد هذه البروتينات هو البروتين Smaug الذى يرتبط بصفة خاصة بالطرف (3'UTR) من الـ Nanos mRNA ثم بعد ذلك يرتبط به البروتين Cup والذى يرتبط به عامل بداية الترجمة eIF4E فى الكائنات حقيقية النواة (شكل ٥٣). ولكى تبدأ الترجمة فى الكائنات حقيقية النواة يتطلب ذلك تفاعل أو ارتباط كل من البروتين eIF4E والبروتين eIF4G. ونظراً لارتباط البروتين eIF4E بالبروتين Cup والذان يرتبطان بالطرف (3'UTR) من الـ Nanos mRNA يجعله غير قادر على التفاعل مع عامل بداية ترجمه eIF4G وبذلك لا تبدأ ترجمة الـ Nanos mRNA ولقد شوهت هذه الآلية من كبت ابتداء الترجمة فى أنواع أخرى عن طريق عدم مقدرة ارتباط بروتينات ابتداء الترجمة eIF4E و eIF4G ببعضهما لابتداء ترجمة الـ mRNA.



شكل (٥٣): يوضح تنظيم التعبير الجيني عند مستوى الترجمة

A- فى غياب البروتين Smaug يتفاعل كل من البروتين eIF4E والبروتين eIF4G وبالتالي يحدث تنشيط لابتداء ترجمة الـ Nanos mRNA ومن ثم يتم ترجمته بواسطة الريبوسوم وينتج البروتين نانوس

B- فى وجود البروتين Smaug يرتبط بالمنطقة التى لا تترجم فى الطرف (3'UTR) من الـ Nanos mRNA وكذلك يرتبط البروتين Cup بالبروتين Smaug ثم يرتبط العامل eIF4E بالبروتين Cup وبذلك لا يتكون مركب ابتداء الترجمة eIF4G - eIF4E ومن ثم يتوقف ترجمة الـ Nanos Mrna إلى بروتين نانوس Nanos protein

رابعاً : تنظيم التعبير الجينى ما بعد الترجمة

Posttranslational level regulation

تنظيم التعبير الجينى بعد الترجمة يكون من خلال تحويل البروتين والذى يؤثر على نشاط وموضع وثبات البروتين داخل الخلية من خلال الآليات التالية:

١- تحويل البروتين (Protein modification)

يمكن تحويل البروتينات بواسطة عدد من الطرق. فالتحورات التى تحدث لبروتينات الهستون تؤثر على تنشيط (Activation) أو كبت (Repression) نسخ الجين. وعلى العكس من ذلك فإن فسفرة البروتين (eIF_2) يغلق ابتداء الترجمة. ويوجد طرازين من التحورات التى تحدث للبروتينات بعد الترجمة وهما:

أ- كسر تتابع الأحماض الأمينية المعروفة باسم التتابع القائد والذى يتركب من ١٥ إلى ٢٥ حامض أمينى الأولى والموجودة بالطرف الذى ينتهى بمجموعة الأمينو الذى يجب أن يكسر إذا كان البروتين سوف يفرز من الخلية أو يدخل هذا البروتين فى الغشاء الخلوى.

ب- إضافة السكريات والدهون إلى البروتينات.

٢- تكسير البروتين (Protein degradation)

الطراز الآخر من تنظيم التعبير الجينى بعد الترجمة يبدو واضحاً وجلياً من خلال ثبات البروتين. فالتكسير السريع لإنزيم ما ينتج عنه فقد فجائى لنشاط هذا الإنزيم وأحد طرز تكسير البروتين تقوم به مجموعة من الإنزيمات المعروفة باسم البروتين Proteases. والطراز الآخر من تكسير البروتين يكون من خلال ارتباط البروتين ابىكتين (Ubiquitin) بالبروتين المراد تكسيه. والابىكتين عبارة عن سلسلة عديدة الببتيد تحتوى على ٧٦ حامض أمينى والتى توجه إلى البروتين لتكسيه من خلال مركب بروتينى كبير يعرف

باسم البروتيسوم (Proteosome). وتحتوى خلية الإنسان الواحدة عل ما بين ٢٠٠٠٠ إلى ٣٠٠٠٠ وحدة بروتينية من البروتيسوم.

مقارنة بين تنظيم التعبير الجيني فى البكتيريا والكائنات حقيقية النواة

Comparison Between Gene Regulation In Bacteria And Eukaryotes

يوجد بعض الأساسيات المتشابهة وكذلك بعض الاختلافات بين البكتيريا والكائنات حقيقية النواة فى تنظيم التعبير الجيني والتشابه بينهما يرجع إلى أن كل منهما يحتوى على بروتينات منشطة (Activators) وبروتينات مكبتة (Repressors) ويمكن تحويل نشاط البروتين الذى يرتبط بالـ DNA وذلك بارتباطه بجزيئات منظمة مساعده. ومع ذلك فالاختلافات بينهما تتلخص فى النقاط التالية:

- ١- فى الكائنات غير حقيقية النواة تكون المواقع الموجودة بالـ DNA التى يرتبط بها البروتينات متجمعة وقريبة من البروموتور بينما فى الكائنات حقيقية النواة تبعد كل من المعززات (Enhancers) والسيلنسرز (Silencers) عن المنطقة النسخية بمسافة مقدارها ١٠٠٠٠ قاعدة شمال أو يمين الوحدة النسخية.
- ٢- فى الكائنات حقيقية النواة يوجد عدد من عوامل تنظيم التعبير الجيني بالإضافة للبروموتورات مثل المعززات والسيلنسرز والعازلات وكل هذه العوامل لا توجد فى البكتيريا.
- ٣- فى الكائنات حقيقية النواة وليس فى البكتيريا تؤثر التحورات التساهمية للبروتينات التى ترتبط بالـ DNA (مثل الفسفرة - إضافة مجاميع الاسيتايل - إضافة مجاميع الميثايل) على نشاط هذه البروتينات وارتباطها بالـ DNA وتنظيم النسخ.
- ٤- فى الكائنات حقيقية النواة وليس فى البكتيريا إضافة مجاميع الميثايل للـ DNA لها تأثير كبير فى كبت (Repression) النسخ.
- ٥- فى الكائنات حقيقية النواة يلعب تنظيم الكروماتين دوراً هاماً فى تنظيم التعبير الجيني وغياب الكروماتين فى البكتيريا يستبعد احتمال استخدامه كآلية لتنظيم التعبير الجيني فى البكتيريا.

٦- على الرغم من أن البروتينات التى ترتبط بالـ DNA وكذلك الـ RNA المضاد المعنى (Antisense RNA) يعتبران من العوامل التى تنظم التعبير الجينى فى كل من البكتيريا والكائنات حقيقية النواة إلا أن الأخيرة تستخدم أيضا الـ RNA الدقيق (miRNA) لتنظيم التعبير الجينى من خلال عديد من الآليات المختلفة.

وترجع بعض هذه الاختلافات إلى الاختلافات الأساسية البيولوجية بين البكتيريا والكائنات حقيقية النواة ومن أمثلة ذلك هو دور الكروماتين الذى يتواجد فقط فى الكائنات حقيقية النواة وكذلك تداخل كل من عملية النسخ وعملية الترجمة فى البكتيريا والتى هى غير ممكنة فى الكائنات حقيقية النواة وذلك لوجود الغلاف النووى فى الكائنات حقيقية النواة والذى يعتبر حاجز يفصل عملية النسخ عن الترجمة وكذلك الحاجة إلى ارتباط الوحدة الريبوسومية الصغيرة (40S) بالطرف 5' cap من الـ mRNA فى الكائنات حقيقية النواة لتبدأ الترجمة يجعل جزيء الـ mRNA متعدد السسترونات (Polycistronic mRNA) غير فعال كآلية لتنظيم التعبير الجينى فى الكائنات حقيقية النواة. وأحد الاختلافات الأخرى تلك الموجودة فى تحويل المنسخ الأولى (hnRNA) إلى جزيء الـ mRNA الناضج والذى يترجم إلى البروتين المناسب تسمح بحدوث الوصل البديل (Alternative splicing) وكذلك المحافظة على الذيل (Poly A tail) فى الـ mRNA تمثل بعض الآليات المستخدمة فى تنظيم التعبير الجينى فى الكائنات حقيقية النواة وغياب ذلك فى البكتيريا يستبعد هذه الآليات فى تنظيم التعبير الجينى فى البكتيريا.

وباختصار فإن كل من البكتيريا والكائنات حقيقية النواة متشابهان فى النمو إلا أن كل منهما يمتلك آليات (Mechanisms) مختلفة لتنظيم التعبير الجينى ورغم ذلك تظل خاصية مشتركة بينهما وهى أن التعبير الجينى وكذلك البروتينات التى تنتجها هذه الجينات يجب أن ينظم تعبيرها الجينى استجابة للظروف البيئية وحاجة الخلية والكائن.

الباب السابع

الهندسة الوراثية Genetic Engineering

الهندسة الوراثية أو هندسة الجينات هي العلم التطبيقي للوراثة الجزيئية (Molecular genetics) وهي أحد فروع التقنية الحيوية (Biotechnology) التطبيقية في مجال علوم الوراثة والذي يرجع إلى التقدم الهائل والكبير الذي حدث في التعامل بكل براعة ودقة مع النظم البيولوجية لدرجة أنه يمكن القول أن الهندسة الوراثية هي نتاج التقدم التكنولوجي في التعامل مع النظم البيولوجية بكل براعة ممكنة. والهدف من هندسة الجينات أو الهندسة الوراثية هو محاولة تخليق (Creation) كائنات لها تركيب جيني جديد (New genotypes) وبالتالي شكل مظهرى (New phenotypes) ومثل هذه الكائنات لا توجد في الطبيعة.

ومما لا شك فيه أن طرق التربية التقليدية للنباتات والحيوانات يمكن استخدامها لإنجاز هذا الغرض والتي تعتمد على استحداث تراكيب جينية جديدة باستخدام المطفرات الكيميائية أو باستخدام الأشعة السينية (X-rays) أو الأشعة فوق البنفسجية (Ultraviolet) متبوعاً بالانتخاب للصفات المرغوبة ، ولكن استخدام هذه الطرق التقليدية من تربية النباتات غالباً ما يجعل علماء الوراثة وتربية النباتات يعتمدون على الحدوث العشوائى لهذه التراكيب الجينية الجديدة من بين عديد من التراكيب الجينية المختلفة والذي غالباً ما يكون عملية معقدة.

وحديثاً تمكن علماء الوراثة الجزيئية وتطبيقاته العملية في مجال هندسة الجينات أو الهندسة الوراثية من التوصل إلى طريقة عملية تمكن الباحثين من معرفة الكائن الذى يحمل التركيب الجينى المرغوب بطريقة مباشرة وسريعة وهذه الطريقة تعرف باسم تكنولوجيا الـ DNA المعاد توليفه (Recombinant DNA technology (R.D.T.) ومفتاح هذه الطريقة هو

نقل الجين (Gene transfer) أو نقل الجينات بين الكائنات المختلفة بغض النظر عن درجة القرابة بين هذه الكائنات لدرجة أنه يمكن نقل الجينات بين البكتيريا والكائنات الراقية سواء النباتية أو الحيوانية والتي لا يمكن تحقيقها بأى حال من الأحوال باستخدام طرق التربية التقليدية. وتسمى هذه الطرق المتبعة فى نقل الجينات عن طريق تكنولوجيا الـDNA المعاد توليفه بالهندسة الوراثية (Genetic engineering) أو باسم كلونة الجينات (Gene cloning). ولقد ساعدت تكنولوجيا الـDNA المعاد توليفه (R.D.T.) كثيراً من مقدرتنا على معالجة الجينومات (Genomes) المختلفة وأحدثت ثورة علمية فى دراسة تركيب الجينات وتنظيم تعبيرها الجينى ويتركز الاهتمام فى الوقت الحالى لاستخدام تكنولوجيا الـDNA المعاد توليفه (R.D.T.) فى عديد من التطبيقات العملية من بينها ما يلى:

- ١- عزل جين معين من جينوم (Genome) كائن ما بغرض هدف معين ومحدد.
- ٢- إنتاج بروتينات معينة وكذلك بعض الهرمونات الهامة بكميات كبيرة وبطريقة اقتصادية.
- ٣- إنتاج أصناف نباتية جديدة تحمل بعض الصفات الهامة والمرغوبة مثل المقاومة الوراثية لبعض الأمراض النباتية أو المقاومة الوراثية للآفات الحشرية وكذلك المقاومة الوراثية لبعض مبيدات الحشائش التى تستخدم على نطاق واسع فى مقاومة الحشائش.
- ٤- إنتاج أصناف نباتية جديدة تحتاج إلى كميات قليلة من الأسمدة الكيميائية لزيادة إنتاجها.
- ٥- تصحيح بعض الأخطاء الوراثية (Genetic defects) والناجمة عن حدوث الطفرات فى الكائنات الراقية ومنها الإنسان.
- ٦- إنتاج أصناف نباتية جديدة لها أهمية اقتصادية مثل التى تنتج مبكراً أو تلك التى تنتج محصولاً عالياً.

وتتلخص طريقة كلونة الجينات (Gene cloning) بكل بساطة فيما يلي:

- ١- عزل جزيئات الـDNA من مصدرين مختلفين بيولوجياً.
- ٢- تجزئة الـDNA (الچينوم) من كلا المصدرين بواسطة إنزيم أو أكثر من إنزيمات القطع المحدد (Restriction enzymes (R.E.) إلى قطع صغيرة من الـDNA.
- ٣- إعادة توليف (Recombined) هذه القطع من الـDNA مرة أخرى مع بعضها بالطريقة التي يمكننا من الحصول على الـDNA المعاد توليفه الذي يحمل الجين أو الجينات المرغوبة.
- ٤- إعادة كلونة (Cloning) هذا الـDNA المعاد توليفه في خلية عائله لزيادة نسخ هذا الجين المرغوب.

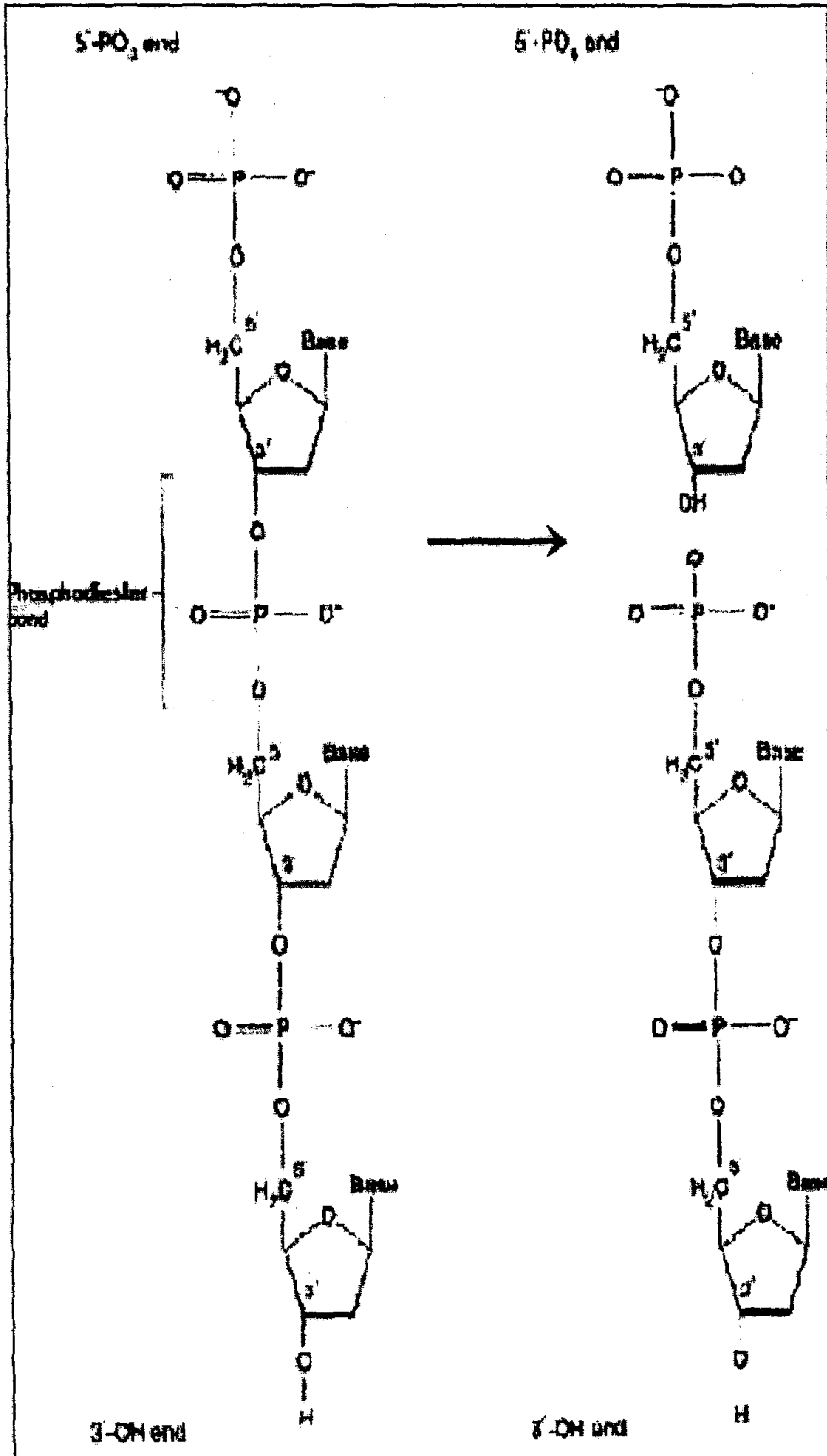
أولاً : عزل الـDNA DNA Isolation

عزل الـDNA من مصادر مختلفة بيولوجياً تعتبر الخطوة الأولى في هندسة الجينات، وتتراوح كمية الـDNA الجافة ما بين ١% من الكمية الكلية لعدد من الكائنات الثديية إلى ٥٠% في الفيروسات وغالباً ما يكون هذا الـDNA مغلفاً بالبروتينات. وفي البكتيريا والخلايا النباتية تتطلب عملية عزل الـDNA كسر الجدر الخلوية التي تتركب من الكربوهيدرات ونظراً لأن هذا الـDNA يكون مرتبط بطرز عديدة من البروتينات المختلفة وبالتالي سوف تختلف طريقة عزل الـDNA من كائن لآخر ومع ذلك توجد خصائص عامة لعزل الـDNA من الكائنات المختلفة وهي تكسير الجدر الخلوية أو تكسير الخلايا ثم بعد ذلك فصل الـDNA عن باقي المكونات الخلوية الأخرى من كربوهيدرات وبروتينات ودهون.

ثانياً : تجزئة أو تقطيع الـDNA إلى قطع صغيرة

وذلك بكسر الرابطة الفوسفودايستر (Phosphodiester) التي تربط النيوكليوتيدات ببعضها في خيطي الـDNA بواسطة قسم خاص من إنزيمات النيوكلييز (Nucleases) والتي منها:

- أ- إنزيمات الأندونوكلييز (Endonucleases) وتقوم هذه الإنزيمات بكسر الرابطة الفوسفودايستر عند مواقع عشوائية داخل التتابع النيوكليوتيدى لخيطة الـ DNA وبالتالي تنتج كسوراً عشوائية.
- ب- إنزيمات الاكسونوكلييز (Exonucleases) وتقوم هذه الإنزيمات بكسر الرابطة الفوسفودايستر الطرفية من خيطة الـ DNA ومن ثم إزالة النيوكليوتيدات الطرفية فقط من خيطة الـ DNA المعاملة بهذا النوع من الإنزيمات.
- ج- إنزيمات الكسر أو القطع المحدد Restriction enzymes (R.S.) وتقوم هذه الإنزيمات بكسر الرابطة فوسفودايستر بين النيوكليوتيدات عند تتابع محدد معين من النيوكليوتيدات والذي يعرف باسم البالندروم (Palindrome) والذي غالباً ما يكون تتابع قصير من النيوكليوتيدات ويترتب على ذلك تكوين كسور فى خيطة الـ DNA ذات أطرف 3'-OH وأطراف 5'-P (شكل ٥٤)، ويختلف هذا البالندروم باختلاف إنزيمات القطع المحدد (R.E.) وكذلك طبيعة الكسور التى تحدثها فى خيطة الـ DNA ولقد أمكن عزل مئات من هذه الإنزيمات من العديد من الكائنات الدقيقة ويبين جدول (٥) بعض هذه الإنزيمات ومصدرها وكذلك البالندروم الخاص بكل إنزيم منها. والدور البيولوجى لإنزيمات القطع المحدد (R.E.) الموجودة فى خلايا الكائنات الدقيقة هو تحطيمها للـ DNA الأجنبى عندما يدخل الخلية العائله، ومع ذلك كيف تقوم هذه الإنزيمات بهذا الدور حتى تستطيع التمييز بين الـ DNA الأجنبى عن ذلك الـ DNA الخاص بالخلية العائله؟



شكل (٥٤): يوضح كسر
 الرابطة الفسفودايستر
 (Phosphdiester) بين
 النيكليوتيدات في خيط
 للـ DNA بواسطة إنزيمات
 القطع المحدد (R.E)
 Restriction enzymes
 وتكوين أطراف 3'-OH
 و 5'-P.

ولقد وجد أن الـ DNA البكتيرى الذى يحمل الجين الذى ينتج إنزيم ما من هذه الإنزيمات والذى يهاجم تتابع محدد ومعين من النيوكليوتيدات (البالندروم) لكى يحدث كسور فى خيطى الـ DNA يكون مقاوم لتأثير الإنزيم بسبب عدم مقدرة الإنزيم على التعرف على هذا البالندروم الخاص به والموجود بالـ DNA للخلية البكتيرية العائله وبالتالي لا يستطيع هذا الإنزيم من إحداث كسور فى خيطى الـ DNA للخلية العائله بينما يقوم بالتعرف على نفس البالندروم الموجود فى الـ DNA الأجنبى ومهاجمته وتحطيمه أو تكسيره. ويرجع ذلك إلى أن البالندروم الموجود فى الـ DNA البكتيرى يضاف إلى أحد النيوكليوتيدات به مجموعة ميثايل مما يجعله مقاوم لتأثير إنزيم القطع المحدد (R.E.) وتنقسم طبيعة الكسور التى تحدثها هذه الإنزيمات إلى ما يلى:

١- إحداث كسور فى مناطق متناظره من البالندروم حيث يقوم الإنزيم بكسر الرابطة الفوسفودايستر فى خيطى الـ DNA عند مناطق متناظره من البالندروم منتجاً قطع من الـ DNA ذات أطراف 3'-OH وأطراف 5'-P تعرف بالقطع ذات الأطراف العمياء Blunt- ends (شكل ٥٥).

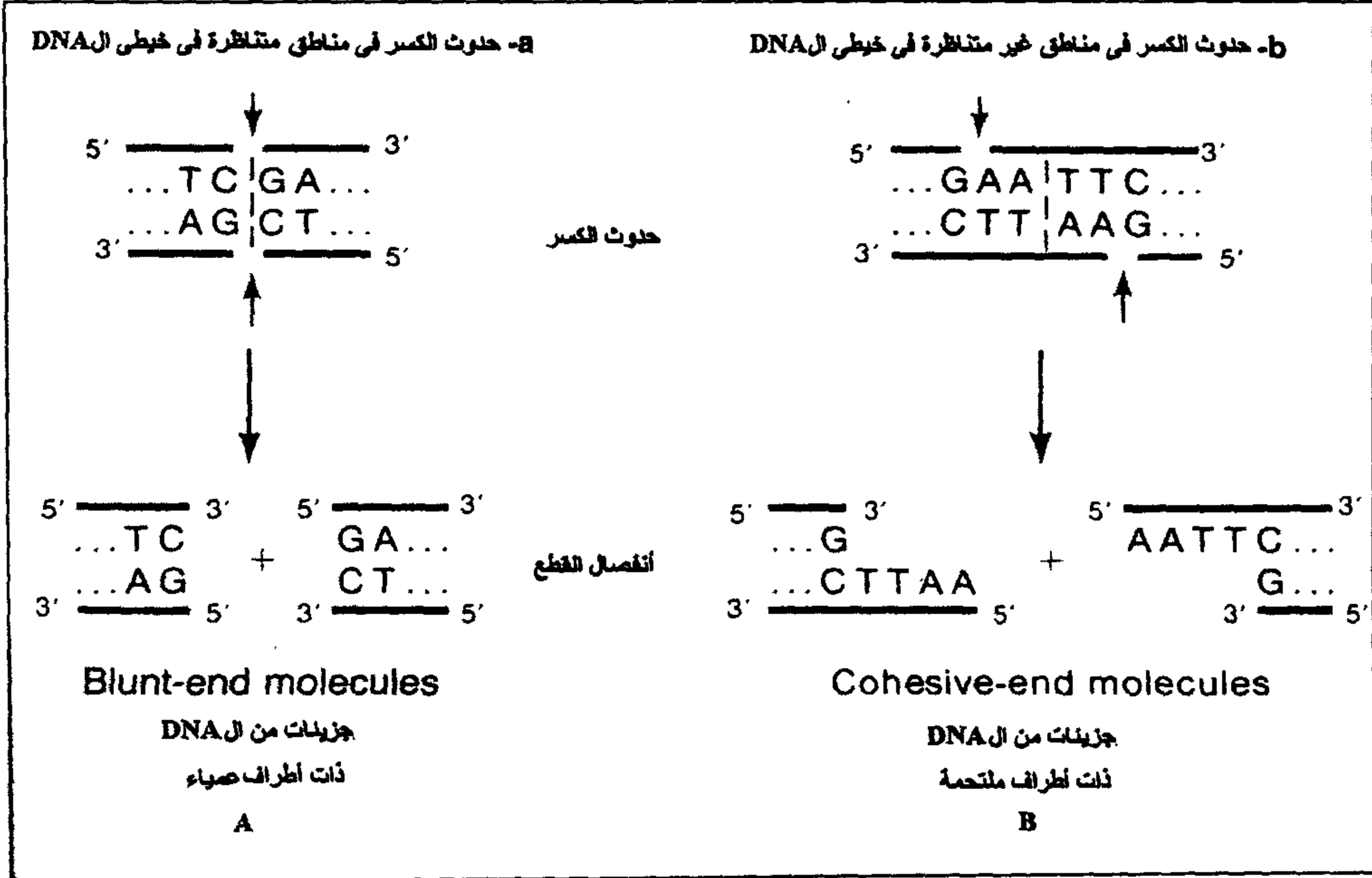
٢- إحداث كسور فى مناطق غير متناظرة من البالندروم حيث يقوم الإنزيم بكسر الرابطة الفوسفودايستر فى خيطى الـ DNA عند مناطق غير متناظرة من البالندروم منتجاً قطعاً من الـ DNA أطرافها غير متساوية فى الطول وهذه الأطراف إما تحتوى على 3'-OH أو تحتوى على 5'-P وتسمى هذه الأطراف بالأطراف الملتحمة (Cohesive ends) وتتميز هذه الأطراف بأنه عندما يقرأ التتابع النيوكليوتيدى عند مناطق الكسر فى الإتجاه 3' → 5' يكون هونفس التتابع فى خيطى الـ DNA عند مناطق الكسر (شكل ٥٥). ومعظم إنزيمات القطع المحدد (R.E.) يتعرف كل إنزيم منها على البالندروم الخاص به بغض النظر عن مصدر هذا الـ DNA. وعلى ذلك فإن قطع الـ DNA الناتجة من تجزئة أو تقطيع الـ DNA بنفس الإنزيم (R.E.) سوف يكون لها نفس النهايات من التتابع

النيوكليوتيدى وخاصة تلك التى تنتج أطراف ملتحمة (Cohesive ends) والتى تعتبر أحد النقاط الهامة فى تكنولوجيا الـ DNA المعاد توليفه (R. D. T).

Name of enzyme	Microorganism	Target sequence and cleavage sites
Generates cohesive ends		
EcoRI	<i>E. coli</i>	$\begin{array}{c} G^{\downarrow} A A T T C \\ C T T A A G \end{array}$
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	$\begin{array}{c} G^{\downarrow} G A T C C \\ C C T A G G \end{array}$
HaeII	<i>Haemophilus aegyptius</i>	$\begin{array}{c} Pu G C G C^{\downarrow} Py \\ Py C G C G Pu \end{array}$
HindIII	<i>Haemophilus influenza</i>	$\begin{array}{c} A^{\downarrow} A G C T T \\ T T C G A A \end{array}$
PstI	<i>Providencia stuartii</i>	$\begin{array}{c} C T G C A^{\downarrow} G \\ G A C G T C \end{array}$
TaqI	<i>Thermus aquaticus</i>	$\begin{array}{c} T^{\downarrow} C G A \\ A G C T \end{array}$
Generates blunt ends		
BalI	<i>Brevibacterium albidum</i>	$\begin{array}{c} T G G C C A \\ A C C G G T \end{array}$
SmaI	<i>Serratia marcescens</i>	$\begin{array}{c} C C C G G G \\ G G G C C C \end{array}$

جدول (٥) : بعض إنزيمات الـ Restriction enzymes ومصادرها والبالندروم (Palindrome) الخاص بها ومناطق الكسر التى تحدثها هذه الإنزيمات سواء تلك التى تنتج الأطراف الملتحمة (Cohesive ends) أو تلك التى تنتج الأطراف العمياء (Blunt ends) ويلاحظ أن الأسهم تشير إلى مكان كسر الرابطة الفسفودايستر فى كلا خطي الـ DNA.

وحيث أن معظم هذه الإنزيمات (R.E.) تتعرف على تتابع نيوكليوتيدى فريد (البالندروم) فإن عدد قطع الـDNA الناتجة من تجزئة الـDNA يكون محدداً. ففي البكتيريا *E. coli* فإن الجينوم البكتيرى (DNA) الذى يحتوى على 3×10^6 زوج من النيوكليوتيدات سوف يتجزأ إلى قطع صغيرة من الـDNA يتراوح عددها ما بين مئات إلى آلاف من القطع تبعاً لنوع الإنزيم المستخدم بينما جينومات (DNA) الثدييات سوف تتجزأ أو تقطع إلى أكثر من مليون قطعه عند استخدام نفس الإنزيم (R.E.) الذى استخدم فى تجزئة جينوم (DNA) البكتيريا ومع ذلك سوف يظل عدد القطع الناتجة من الـDNA أقل بكثير من عدد الروابط الفوسفودايستر الموجوده بالكائن.



شكل (٥٥) يوضح طرز كسر مناطق البالندروم بواسطة إنزيمات الـ(R.E.) Restriction enzymes

- a-** حدوث كسر الروابط الفوسفودايستر فى كلا الخطين الـDNA فى مناطق متناظرة من البالندروم منتجاً أطراف ذات نهايات 3'-OH وأطراف ذات نهايات 5'-P مكوناً جزيئات أو قطع ذات أطراف عمياء (Blunt ends).
- b-** حدوث كسر الروابط الفوسفودايستر فى كلا خيطي الـDNA فى مناطق غير متناظرة من البالندروم منتجاً قطع من الـDNA ذات أطراف مختلفة فى الطول وذات نهايات 3'-OH وأطراف ذات نهايات 5'-P منتجاً قطع من الـDNA ذات الأطراف الملتصقة (Cohesive ends).

وبوجه خاص فإن جزيئات الـ DNA الصغيرة أو الجينومات الصغيرة مثل الفيروسات (Viruses) والبلازميدات (Plasmids) تحتوى ما بين واحد إلى عشرة مواقع تعرف (بالاندروم) تتعرف عليها إنزيمات القطع المحدد (R.E.) ولكن البلازميدات التى تحتوى على موقع تعرف واحد والذي يتعرف عليه أحد هذه الإنزيمات (R.E.) تكون أكثر فائدة فى استخدامها كحاملات (Vector) للجين المنقول (T.G.) Transgene.

ثالثاً: وصل (joining) قطع الـ DNA أو الجين المنقول بالحامل (Vector) المناسب

فى مجال هندسة الجينات يتم وصل قطعة الـ DNA التى تحمل الجين المنقول (T.G.) بقطعه أخرى صغيرة من الـ DNA تكون قادره على التضاعف الذاتى والتى تعرف بحامل الكلونه (Cloning vector). وعموماً تستخدم البلازميدات البكتيرية كحاملات للجينات المنقولة وتكوين ما يعرف بالبلازميد المعاد توليفه (Recombinant plasmid (R.P.) والذي يتركب من البلازميد البكتيرى بالإضافة إلى الجين المنقول (T.G.) Transgene وبعض العناصر الأخرى التى سوف نتناولها فيما بعد.

رابعاً: كلونة الجين المنقول Cloning Transgene

أبسط طريقة لكلونة الجين المنقول أو لكلونة جين ما هى طريقة التحول البكتيرى (Bacterial transformation) حيث تستخدم البكتيريا لإكثار (Cloning) الجين المنقول (T.G.) وكذلك للكشف عن تواجده فى الخلية البكتيرية المتحولة وراثياً وذلك بإدخال البلازميد البكتيرى المعاد توليفه (R.P.) وما يحمله من الجين المنقول (T.G.) داخل الخلية البكتيرية العائلة (شكل ٥٦) خلال الخطوات التالية:

١- عزل قطعه من الـ DNA من جينوم الضفدع (Frog) على سبيل المثال بعد تجزئة الجينوم بأحد إنزيمات القطع المحدد (R.E.) وكذلك عزل بلازميد بكتيرى وكسره بواسطة نفس إنزيم القطع المحدد (R.E.).

٢- تكوين البلازميد المعاد توليفه (R.P.) عن طريق إضافة قطعة الـ DNA المأخوذة من جينوم الضفدع إلى البلازميد البكتيرى المكسور.

٣- إحداث التحول الوراثى البكتيرى بإضافة البلازميد البكتيرى المعاد توليفه (R.P.) إلى خلية بكتيرية عائلته ثم أنتخاب الخلايا البكتيرية العائلته التى تحتوى على البلازميد المعاد توليفه وما يحمله من الجين المنقول باستخدام طرق الانتخاب المتبعة فى ذلك والتى سوف نتناولها بالتفصيل فيما بعد.

٤- تنمية الخلايا البكتيرية المكونه بالبلازميد المعاد توليفه وما يحمله من الجين المنقول على البيئة الغذائية المناسبة للحصول على سلالة مكلونه (Bacterial clone) تحمل الجين المنقول وهذه السلالة البكتيرية لا تتواجد فى الطبيعة.

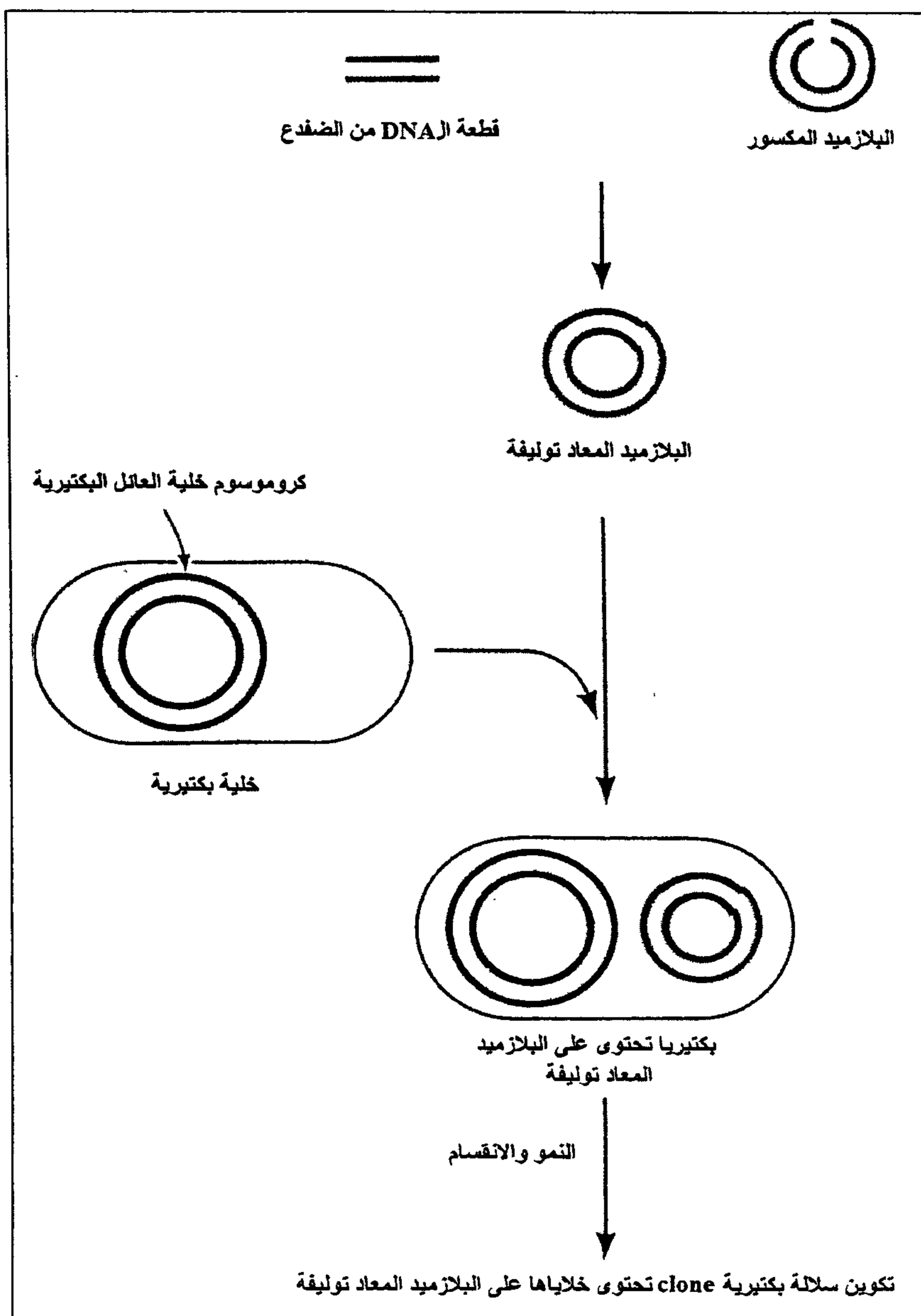
Joining DNA Fragments

وصل قطع الـ DNA

أ- وصل قطع الـ DNA ذات الأطراف الملتحمة (Joining fragments with cohesive ends)

يمكن لقطعتين من الـ DNA المأخوذة من مصادر بيولوجية مختلفة والناجمة من معاملة الجينومين المختلفين بنفس إنزيم القطع المحدد (R.E.) والتى تكون قطع ذات أطراف ملتحمة أن ترتبط ببعضها عن طريق الاقتران بين أزواج القواعد المكملية (Complementary bases) عند هذه الأطراف كما هو مبين فى (الشكل ٥٧) على النحو التالى:

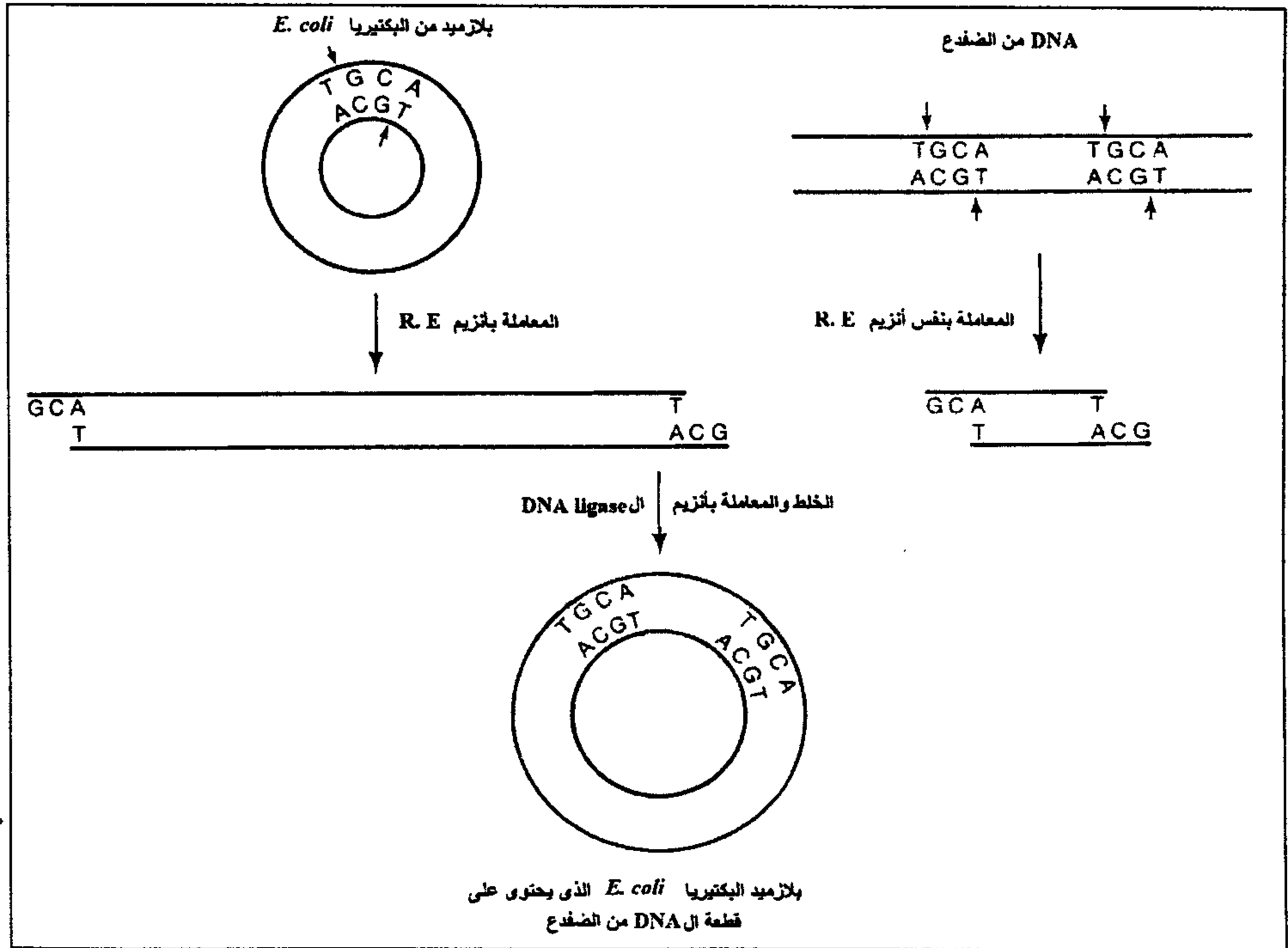
١- معاملة قطعة الـ DNA المأخوذة من الضفدع بأحد إنزيمات القطع المحدد (R.E.) التى تسبب كسور فى خيطى الـ DNA مكوناً أطراف فى خيطى الـ DNA عند منطقة الكسر ذات أطراف ملتحمة ويجب ملاحظة أن هذا النوع من الإنزيمات المستخدمه هى من طراز الإنزيمات تحدث كسوراً عند مناطق غير متناظرة فى البالدروم فى كلا خيطى الـ DNA وكذلك معاملة البلازميد البكتيرى بنفس الإنزيم.



شكل (٥٦) : خطوات كلونه الجين (Gene cloning)

٢- خلط ناتج الخطوة السابقة معاً لوصل القطعتين معاً من الـ DNA عن طريق الاقتران بين أزواج القواعد المكملة عند الأطراف ذات الأطراف الملتحمة وفى وجود إنزيم DNA ligase الذى يقوم بتكوين الرابطة فوسفودايستر فى مناطق الفجوات (Gaps) الموجوده بالأطراف المكسوره من خيطى الـ DNA.

٣- تكوين البلازميد المعاد توليفه (R.P.) الذى يتركب من البلازميد وقطعه الـ DNA المأخوذ من جينوم (DNA) الضفدع (Frog).



شكل (٥٧) : يوضح بناء وتكوين بلازميد (Plasmid) معاد توليفه (R.P.) يحمل قطعة من الـ DNA من الضفدع ذات الأطراف الملتحمة بعد معاملة كل من قطعة الـ DNA المأخوذة من الضفدع وكذلك البلازميد البكتيري بنفس إنزيم القطع المحدد (R.E.) والذي يحدث كسوراً ذات أطراف ملتحمة وتوضح الأسهم القصيرة مكان حدوث الكسر فى البالندروم فى كل من الـ DNA المأخوذ من الضفدع (Frog) والبلازميد البكتيري.

ب- وصل قطع الـ DNA ذات الأطراف العمياء

(Joining DNA fragment with blind-ends)

يمكن لقطع الـ DNA ذات الأطراف العمياء والناشئة من معاملة الـ DNA باى من الإنزيمات التى تحدث كسوراً فى البالندروم عند مناطق متناظرة من خيطى الـ DNA باستخدام الطرق التالية:

١- الطريقة المباشرة (Direct method)

يستخدم فى هذه الطريقة المباشرة إنزيم DNA ligase والذى ينتجه الفيرس T4 عند تكاثره داخل البكتيريا العائلة *E. coli* ويختلف هذا الإنزيم عن باقى إنزيمات الـ DNA ligase الأخرى فى أنه يقوم بلحم seals الكسور الموجودة فى الخيط المفرد للـ DNA مزدوج الخيط وكذلك يمكنه أيضاً أن يقوم بوصل قطع الـ DNA ذات الأطراف العمياء.

٢- طريقة وصل الذيل المتجانس: (Homopolymer tail joining)

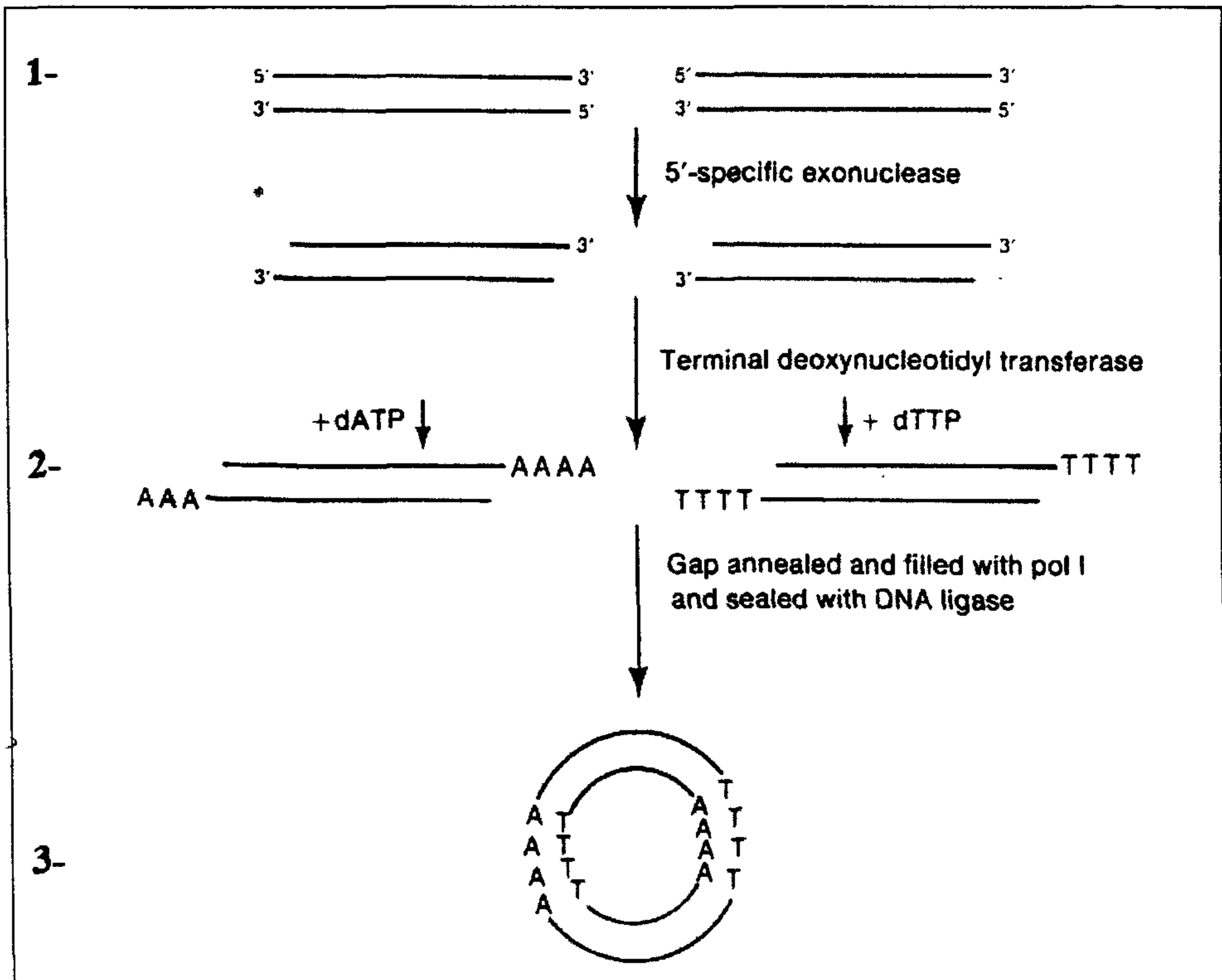
وفى هذه الطريقة يستخدم إنزيم بلمرة الـ DNA (DNA polymerase) غير عادى يمكن الحصول عليه من نسيج حيوانى حيث يقوم هذا الإنزيم بإضافة النيوكليوتيدات ثلاثية الفوسفات للطرف 3'-OH لقطع الـ DNA المفردة الخيط دون الحاجة إلى وجود خيط الـ DNA المطبعى وتتلخص هذه الطريقة فيما يلى (شكل ٥٨):

١- معاملة جزيء الـ DNA بإنزيم 5'-Specific exonuclease لإزالة عدد قليل من النيوكليوتيدات الطرفية من الطرف 5' من كلا خيطى الـ DNA.

٢- معاملة قطع الـ DNA الناتجة من الخطوة السابقة بإنزيم الـ Terminal deoxyribonucleotide transferase وفى وجود طراز واحد من النيوكليوتيدات مثل dTTP فسوف يحدث إضافة العديد من الـ dTTP إلى الطرف 3'-OH فى كلا خيطى الـ DNA مكونة ما يعرف بالذيل (Poly dT tail) وإذا استخدم نيوكليوتيدات الأدينين فسوف

يحتوى على العديد من نيوكليوتيدات الأدينين (Poly dA tail) فى الطرف 3'-OH وعلى ذلك يمكن وصل جزيئين من الـDNA ببعضهما إذا وضع الذيل (Poly dT tail) فى أحد الخيطين ووضع الذيل (Poly dA tail) فى الخيط الآخر.

٣- تملأ الفجوات gaps فى الجزيء المتصل بالمعاملة بإنزيم بلمرة الـDNA وغالباً يستخدم إنزيم بلمرة الـDNA المستخلص من البكتيريا *E. coli* وهو إنزيم *E. coli* polymerase ويتم لحم الفجوات المتبقية فى خيوط الـDNA المفردة بواسطة إنزيم الـDNA ligase. وهذه الطريقة هى طريقة عامة لوصل قطع من الـDNA ببعضها.

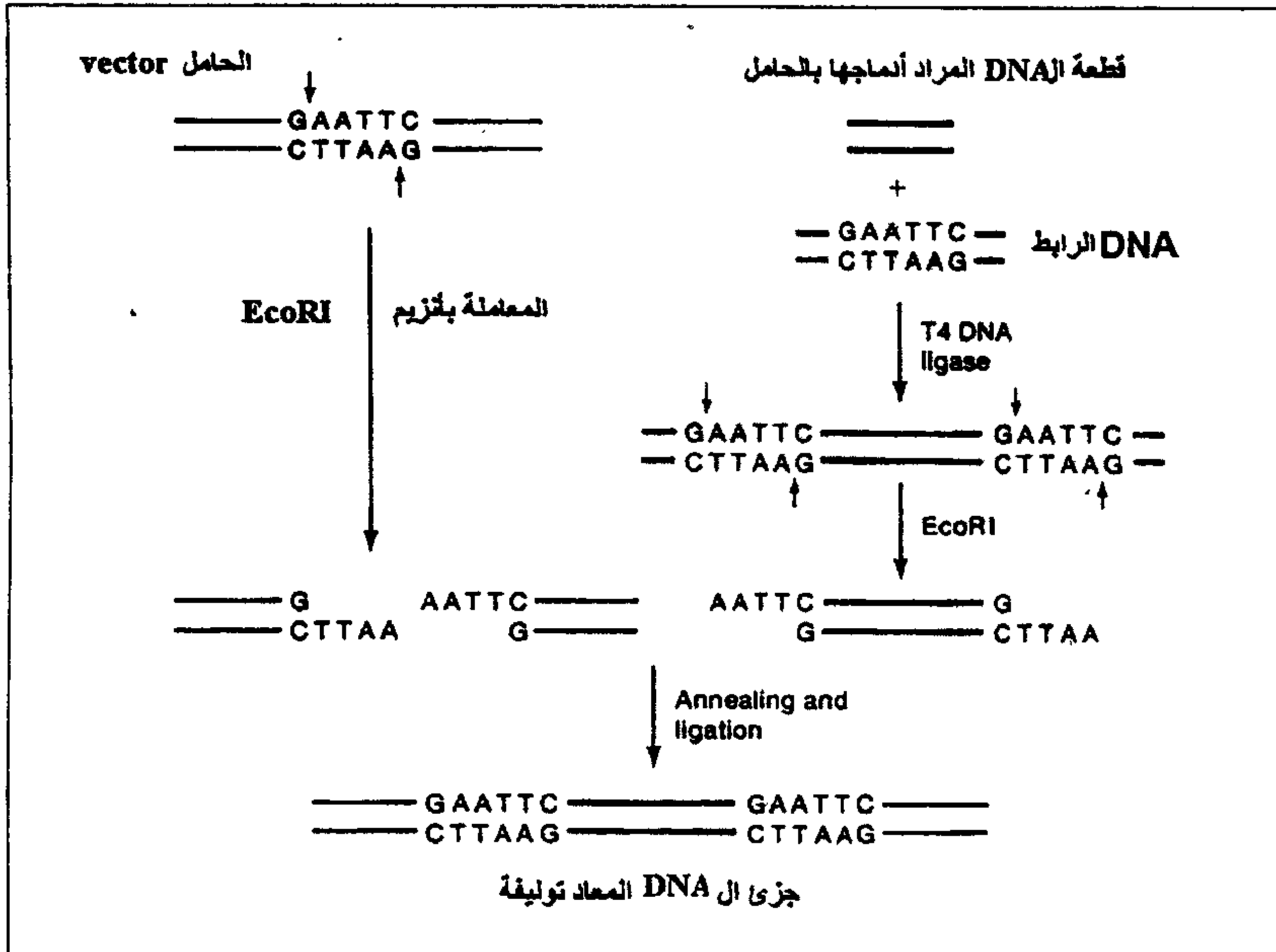


شكل (٥٨): يوضح وصل خيوط من الـDNA ذات الذيل المتجانس

(Complementary homopolymer tails)

ج- وصل قطع من الـ DNA ذات أطراف ملتحمة بأخرى ذات أطراف عمياء وتعرف هذه الطريقة باسم الرابط (Linker) يمكن إجراء هذه الطريقة بإتباع الخطوات التالية (شكل ٥٩):

- ١- في هذه الطريقة يتم تخليق قطعه من الـ DNA عديد النيوكليوتيدات تتركب من تتابع معين من النيوكليوتيدات والذي يمثل البالندروم الموجود بالحامل (Vector) والذي يتم كسره بواسطة أحد إنزيمات الـ R.E. والتي تحدث أطراف ملتحمة .
- ٢- يستخدم إنزيم الـ T4 DNA ligase في ربط قطعة الـ DNA عديدة النيوكليوتيدات (الرابط) بقطعة الـ DNA المراد ربطها بالحامل (Vector).
- ٣- معاملة كل من الحامل وناتج الخطوة السابقة بنفس إنزيم القطع المحدد (R.E.) مثل إنزيم الـ EcoRI لإحداث كسور في نفس البالندروم في كلاهما عند مناطق غير متناظرة مكوناً أطراف ملحمه (Choessive-ends) وبذلك سوف تتكون أطراف ذات قواعد مكملية في كلاهما وبالتالي يصبح ممكناً وصلهما وتكوين الـ DNA المعاد توليفه.



شكل (٥٩) يوضح استخدام الرابط (Linker) في تكوين الـ DNA المعاد توليفه. وتشير الأسهم الرأسية إلى مكان الكسور داخل البالندروم في مناطق غير متناظرة من خيطي الـ DNA.

انتخاب البلازميد المعاد توليفه Selection of Recombinant Plasmid (R.P.)

عند معاملة الحاملات (Vector) أو البلازميدات البكتيرية بإنزيم ما من إنزيمات القطع المحدد (R.E.) وكذلك معاملة جينوم (DNA) كائن ما بنفس الإنزيم وخلطها معاً للحصول على بلازميدات معاد توليفها (R.P.) فسوف يتكون عديد من طرز هذه البلازميدات المعاد توليفها التالية:

١- بعضها لا تحمل أى قطعة من الـDNA الأجنبى أو الجين المنقول (T.G.).

٢- بعضها يحمل قطعة من الـDNA الأجنبى أو الجين المنقول (T.G.).

٣- البعض الآخر يحمل عديد من قطع الـDNA الأجنبى أو الجين المنقول (T.G.). وهذا الطراز الأخير لا يستقر داخل الخلية البكتيرية العائلة لأنه غالباً ما ينقصها منطقة منشأ التضاعف وكذلك الجينات المسؤولة عن تضاعفه وبالتالي فإنها تعتبر ليست ذات أهمية.

وعلى ذلك فإنه لتسهيل عزل البلازميد المعاد توليفه (R.P.) والذي يحمل الجين المنقول (T.G.) فإنه يجب استخدام وسائل تحقق هذا الهدف والتي يوجد العديد منها من الناحية العملية منها طريقة التحول البكتيرى التالية :

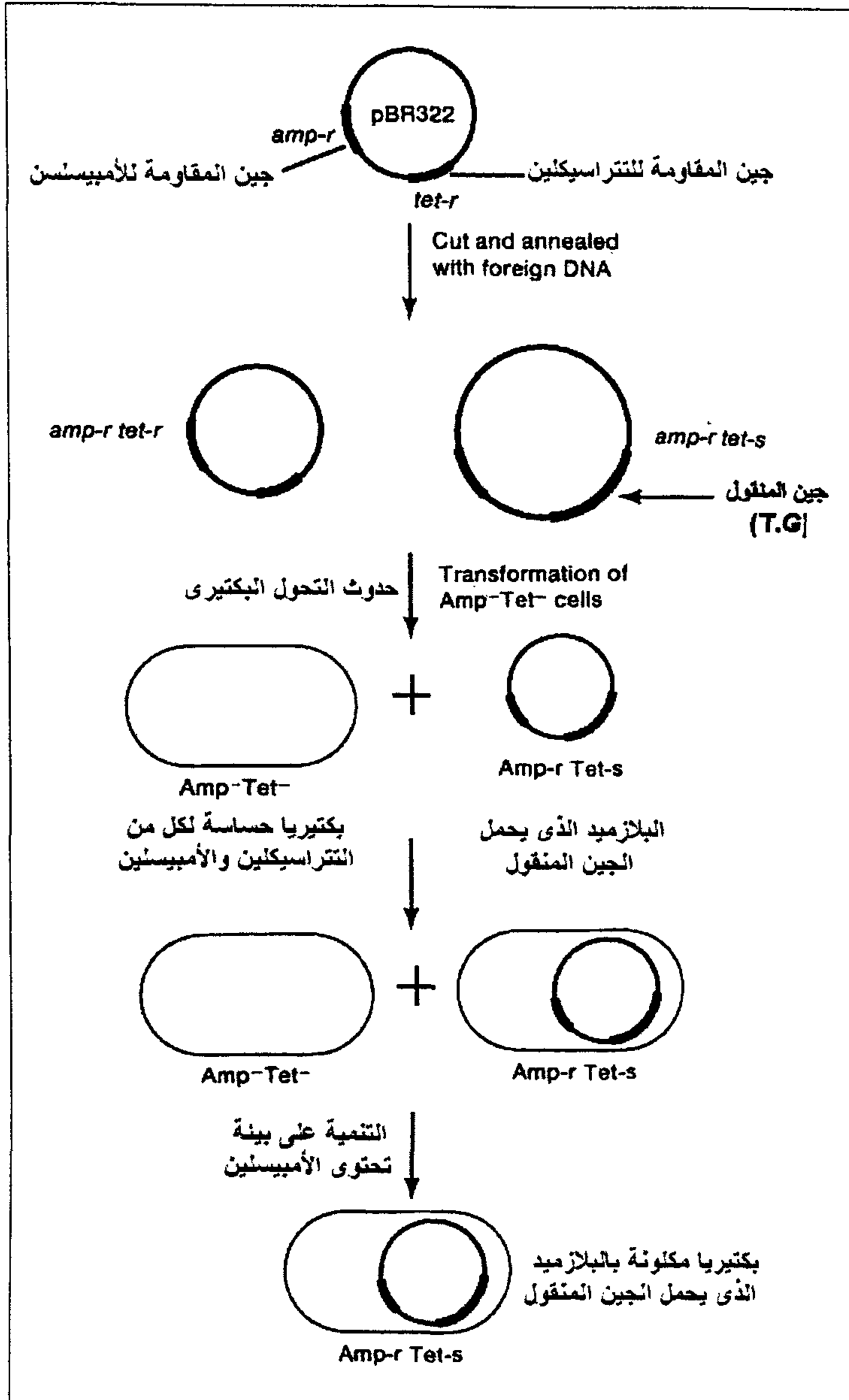
طريقة التحول البكتيرى Bacterial transformation

وتعرف هذه الطريقة باسم التحول البكتيرى بمساعدة كلوريد الكالسيوم (CaCl_2) (شكل ٦٠) والهدف الأساسى لهذه الطريقة هو عزل البكتيريا التى تحتوى على البلازميد المعاد توليفه (R.G.) من بين المستعمرات البكتيرية العديدة والنامية على البيئة الغذائية. وتتضمن هذه الطريقة أن يحتوى البلازميد المعاد توليفه على:

١- الجين المنقول (T.G.) Transgene.

٢- الجين المخبر (R.G.) Reporter gene للكشف عن الجين المنقول وغالباً ما يكون جين المقاومة لأحد المضادات الحيوية.

٣- بعض العناصر الأخرى الضرورية والتي سوف نتناولها بالتفصيل فيما بعد.



شكل (٦٠) : يوضح طريقة البلازميد PBR322 وكلونته وما يحمله من الجين المنقول (T.G.) في بكتيريا حساسة لكل من المضاد الحيوي التتراسيكلين والأمبيسلين $Amp^- Tet^-$ والحصول على بكتيريا مكلونة (Bacterial clone) بالبلازميد المعاد توليفه بالجين المنقول (R.P.) (T.G.)

ومن البلازميدات البكتيرية المفيدة والتي تستخدم فى هذا الغرض البلازميد المعروف باسم pBR322. وهو بلازميد صغير يتركب من ٤٣٦٢ زوج من النيوكليوتيدات ويحتوى على جين المقاومة للمضاد الحيوى التتراسيكلين (Tet-r) وجين المقاومة للمضاد الحيوى الامبيسلين (Amp-r) ويستخدم هذا البلازميد بادخال الجين المنقول (T.G.) داخل جين المقاومة للمضاد الحيوى التتراسيكلين (Tet-r) لاحتوائه على بالندروم لأحد إنزيمات القطع المحدد (شكل ٦٠) وبذلك يصبح جين المقاومة للمضاد الحيوى التتراسيكلين حساس له (Tet-s).

ويستخدم هذا البلازميد pBR322 المعاد توليفه بالجين المنقول (T.G.) فى انتخاب البكتيريا التى تحتوى عليه بتنميتها على بيئة غذائية تحتوى على المضاد الحيوى الامبيسلين حيث يضاف البلازميد المعاد توليفه (R.P.) السابق إلى بكتيريا حساسه لكل من المضاد الحيوى التتراسيكلين والامبيسلين (Tet-s Amp-s) وفى وجود أيونات كلوريد الكالسيوم يحدث ادخال لهذا البلازميد المعاد توليفه بالجين المنقول إلى البكتيريا الحساسه لكلا المضادين الحيويين السابقين ثم بعد ذلك يضاف المضاد الحيوى الامبيسلين إلى البيئة الغذائية وبالتالي تؤدي هذه المعاملة إلى موت الخلايا التى لم تحصل على البلازميد المعاد توليفه (R.P.) بينما تعيش وتستمر فى النمو البكتيرية التى حصلت البلازميد المعاد توليفه مكونة مستعمرة بكتيرية جميع خلاياها تحتوى على البلازميد المعاد توليفه وما تحمله من الجين المنقول (T.G.) وتسمى هذه البكتيريا بالبكتيريا المكلونة (Bacterial clone) بالجين المنقول (T.G.).

كلونة البكتيريا بجينات الكائنات حقيقية النواة

c-DNA method

أولاً: طريقة الـ c-DNA

فى كل من الكائنات حقيقية النواة وغير حقيقية النواة يحدث انتخاب البلازميد أو الحامل (Vector) الذى يحمل جين معين بطريقة غير مباشرة. ومن الناحية النظرية من السهل التحقق من وجود جين ما من خلال تعبيره الجينى والذى ينتج شكلاً مظهرياً (Phenotype) معيناً ، ومع ذلك فإن كل جينات الكائنات حقيقية النواة لا تنتج مثل هذا الشكل المظهرى الذى يمكن التحقق من

خلاله على وجود الجين وكذلك فإنه بالنسبة للجينات حقيقية النواة فإن الجين الذى تم وصله ببلازميد بكتيرى معين وتكوين بلازميد معاد توليفه (R.P.) قد يفشل هذا الجين فى التعبير الجينى داخل الخلية البكتيرية المكونه بهذا الجين لعدد من الأسباب من بينها:

١- قد لا يحدث نسخ لهذا الجين فى الخلية البكتيرية العائله.

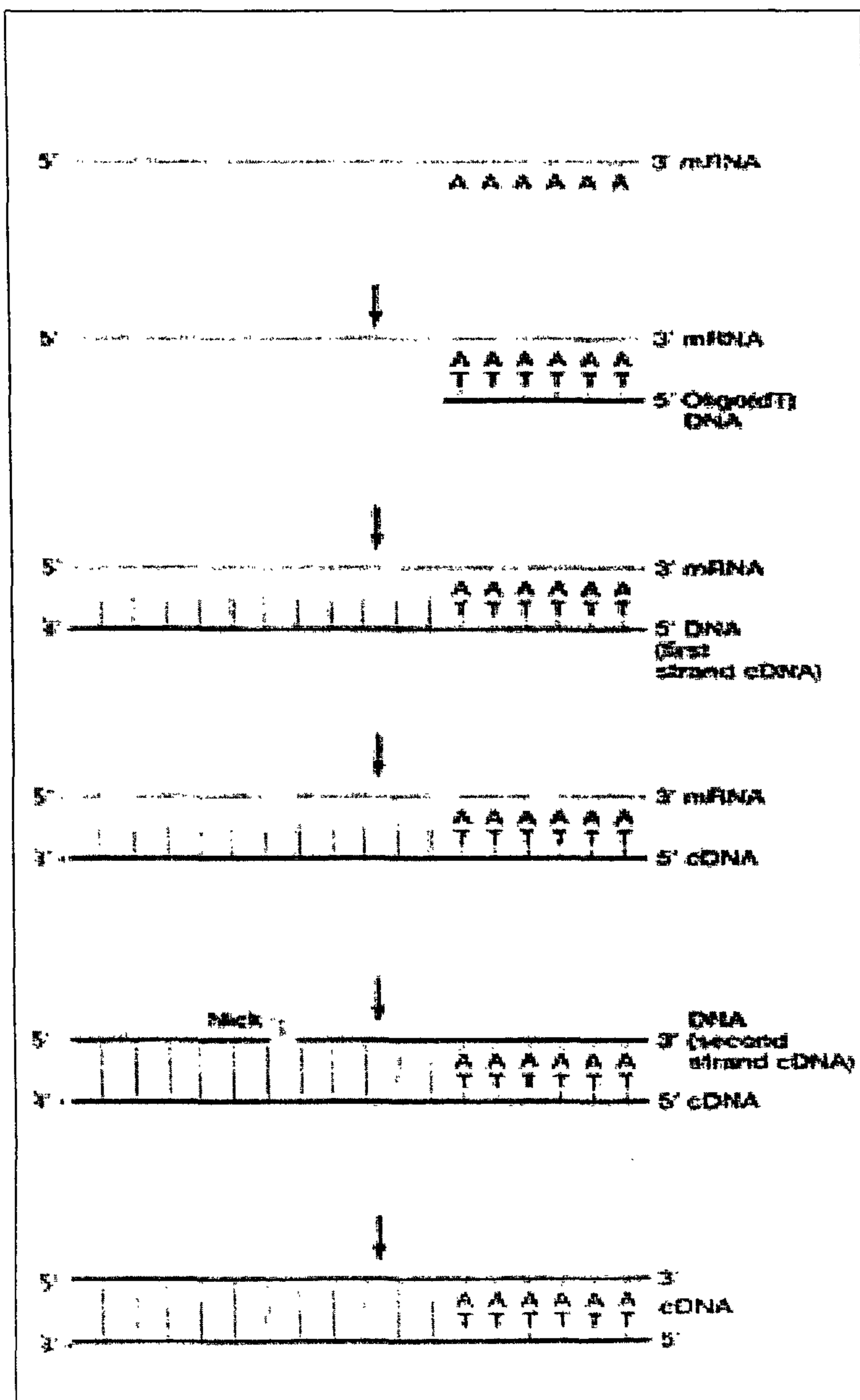
٢- وإذا حدث له نسخ فإنه قد تفشل ترجمة mRNA للبروتين المناسب وذلك لأسباب عديدة سوف نتناولها بالتفصيل فيما بعد.

وللتغلب على هذه العقبات التى تواجه التعبير الجينى للجينات حقيقية النواة عند كلونتها (Cloning) فى البكتيريا العائله تستخدم طريقة تخليق الجين صناعياً باستخدام النسخ العكس (Reverse Transcription) لجزيئات mRNA الناضجة والمعزولة من خلايا الكائنات حقيقية النواة. فإذا افترضنا أننا نرغب فى كلونه (Cloning) جين من الدجاج وهو جين إنتاج بروتين أوفالبيومين (Ovalbumin) فى بلازميد بكتيرى فإن ذلك لا يتطلب معرفة التتابع النيوكليوتيدى لهذا الجين ولكن يتطلب تكوين بلازميد معاد توليفه (R.E.) يحمل هذا الجين والذى يتم بمعاملة كل من البلازميد البكتيرى والـ DNA المعزول من خلايا الدجاج بنفس إنزيم القطع المحدد (R.E.) ثم بعد ذلك تجرى الخطوات السابقة الذكر والتى تؤدى فى النهاية إلى حدوث التحول الوراثى البكتيرى بواسطة هذا البلازميد المعاد توليفه (R.P.) وما يحمله من جين إنتاج بروتين الاوفالبيومين ومع ذلك فإن تحديد المستعمره البكتيرية التى تحتوى على هذا البلازميد المعاد توليفه (R.P.) لا يمكن إنجازه وذلك لأن الخلايا البكتيرية العائله لا تستطيع تخليق هذا البروتين لإحتواء هذا الجين على الانترونات (Introns) وأن البكتيريا العائله لا تحتوى على الإنزيمات اللازمة لإزالة الانترونات وتجميع الاكزونات (Exons) من الـ hnRNA الناتج وتكوين الـ mRNA الناضج الذى يجب ترجمته بواسطة الريبوسومات البكتيرية إلى بروتين الاوفالبيومين. لذلك يجب البحث عن وسيلة أخرى لأكتشاف الخلايا البكتيرية المكونه والمرغوبه مثل تهجين الـ DNA البكتيرى مع أى من المنسخ الأولى (hnRNA) أو مع الـ mRNA الناضج والناتجين من نسخ جين الاوفالبيومين والمعزول من خلايا الدجاج ، ولكن نظراً لأن الخلايا البكتيرية العائله المكونه بالجين تكون بمعدل خلية بكتيرية واحدة لكل 10^7 خلية بكتيرية فلذلك تعتبر هذه الطريقة ممله ومن ثم تستخدم طريقة

الـ c-DNA ونظراً لأن بعض طرز الخلايا الحيوانية مثل تلك التى تنتج بروتين الاوفالبيومين تقوم بتخليق نوع واحد من البروتينات الخلوية أو عدد قليل من أنواع البروتينات المختلفة فإنه يمكن عزل جزيئات mRNA الناضجة والخالية من الأنترونات من سيتوبلازم هذه الخلايا حيث تمثل جزيئات الـ mRNA الغالبية العظمى من الـ RNA الخلوى الموجود بالسيتوبلازم ومن ثم فإن عينات الـ mRNA النقية عادة ما تحتوى على نوع واحد من جزيئات الـ mRNA المعزولة والنقية من الخلايا الحيوانية والتى سوف تترجم إلى بروتين الاوفالبيومين ، وعلى ذلك فإن الجينات التى من هذا الطراز والتى تنتج معظم البروتين الخلوى يكون من السهل كلونتها (Cloning) بالبكتيريا العائله حيث تعمل جزيئات الـ mRNA المستخلصة والنقية من هذه الخلايا الحيوانية كنقطة بداية لتخليق أو تكوين مجموعة من البلازميدات البكتيرية المعاد توليفها (R.P.) والتى يحتوى العديد منها على جين واحد فقط من الجينات المرغوبة.

والعديد من الفيروسات الحيوانية المعروفة باسم الرتروفيروسات (Retroviruses) التى مادتها الوراثية هى الـ RNA وعوائلها هى الخلايا الحيوانية والتى تسبب أوراماً فى الحيوانات تحتوى هذه الفيروسات على إنزيم النسخ العكسى (Reverse transcriptase) داخل الجزيئات الفيروسية ، ويتميز هذا الإنزيم بأنه يمكنه أن يستخدم الخيط المفرد من الـ RNA كخيط مطبعى (Template) (مثل الـ mRNA) وبآلية غير مفهومه تماماً يستطيع هذا الإنزيم تخليق نسخة مزدوجة الخيط من الـ DNA تعرف باسم c-DNA فإذا كان هذا الخيط المطبعى هو عبارة عن خيط الـ mRNA الناضج والخالى تماماً من الأنترونات فإن جزيء أو الخيط المزدوج من الـ DNA الناتج (c-DNA) سوف يحتوى على الأكرونات فقط والتى تمثل التتابع النيوكليوتيدى الشفرى اللازم لتكوين البروتين المناسب (شكل ٦١).

وإذا كان الغرض من تكوين البلازميد المعاد توليفه باستخدام الـ c-DNA هو استخدام البكتيريا كخلايا عائله لإنتاج نشاط جين من جينات الكائنات حقيقية النواة فإنه يمكن الحصول على هذا البلازميد المعاد توليفه (R.P.) بالجين المرغوب c-DNA باستخدام طريقة وصل قطع الـ DNA ذات الأطراف العمياء سابقة الذكر وغالباً ما يستخدم طريقة الرابط (Linker) لهذا الغرض.



شكل (٦١) يوضح خطوات تخليق الـ c-DNA من الـ mRNA

The use of synthetic genes**ثانياً : طريقة الجينات المخلقة صناعياً**

تنتج الكائنات الراقية مثل الإنسان عديد من الهرمونات التى تتركب من سلاسل عديدة الببتيد (Polypeptide chains) والتى لها أهمية طبية عظيمة ومثل هذه الهرمونات قد يتركب بعضها من عدد قليل من الأحماض الأمينية. وفى معظم الحالات يكون من الصعب عزل الجين الذى ينتج هرمون ما من هذه الهرمونات فضلاً عن أنه من الصعب عزل جزيئات mRNA التى تترجم إلى أى من هذه الهرمونات.

و نظراً لأنه أصبح معروفاً بكل دقة تتابع الأحماض الأمينية فى السلسلة عديدة الببتيد لعديد من هذه الهرمونات وبالتالي معرفة التتابع النيوكليوتيدى الذى يمثل الشفرات اللازمة للتعبير عن هذه الأحماض الأمينية، وكذلك إمكانية تخليق قطع من الـDNA الصغيرة معملياً ذات تتابع نيوكليوتيدى معروف، فإنه من الممكن عملياً تخليق الشفرات اللازمة للتعبير عن هرمون ما من هذه الهرمونات. ولكى تكون هذه الجينات المخلقة صناعياً فعالة وظيفياً يجب أن يبدأ تتابعها النيوكليوتيدى بشفرة بداية نسخ الجين (Initiation codon) وكذلك يجب أن تنتهى بتتابع نيوكليوتيدى يحدد إنهاء نسخ الجين أو شفرة توقف الاستمرار فى النسخ (Stop codon) ، ومن ثم فإنه بمجرد تخليق الجين صناعياً بالصورة السابقة يمكن وصله بالبلازميد المناسب بأى طريقة من طرق وصل قطع الـDNA سابقة الذكر وحتى وقتنا الحالى فإن أكبر جين أمكن تخليقه صناعياً بهذه الطريقة هو جين الإنتروفيرون (Interferon) وهو الذى ينتج بروتين الإنتروفيرون (المضاد لنشاط الفيروسات) حيث يتركب هذا الجين من ٥١٠ زوج من النيوكليوتيدات والتى تمثل الشفرات اللازمة والكافية للتعبير عن الأحماض الأمينية الموجودة فى بروتين الإنتروفيرون، والتى يبلغ عددها ١٧٠ حامض أمينى.

Constructing A library of Genesإنشاء مكتبة الجينات

تستخدم مكتبة الجينات فى الأغراض التالية:

١- إكتشاف جينات جديدة.

٢- تحديد التتابع النيوكليوتيدى لكل الجينوم (Genome) لكائن ما.

٣- مقارنة الجينات فى الكائنات المختلفة

ويتم بناء أو إنشاء مكتبة الجينات لكائن ما تباع الخطوات الأساسية التالية:

١- عزل الـ DNA الكروموسومى من كائن ما مثل البكتيريا أو الفطريات أو الإنسان أو أى نوع نباتى أو حيوانى.

٢- تجزئة هذا الـ DNA المعزول إلى قطع صغيرة من الـ DNA بواسطة إنزيم من إنزيمات القطع المحدد (R.E.).

٣- معاملة الحامل (Vector) المناسب لقطع الـ DNA الصغيرة السابقة بنفس إنزيم القطع المحدد (R.E.).

٤- خلط قطع الـ DNA الكروموسومية السابقة بالحامل المناسب لتكوين قطع الـ DNA المعاد توليفها وذلك بوصلها أو ربطها بالحامل المناسب.

٥- إحداث التحول الوراثى للبكتيريا *E. coli* بقطع الـ DNA المعاد توليفها السابقة.

٦- عزل عدد كبير من البكتيريا *E. coli* المعدلة جينياً بقطع الـ DNA المعاد توليفها.

مكتبات التعبير الجينى للكائنات حقيقية النواة

Eukaryotic Expression Libraries

فى مكتبات التعبير الجينى لجينات الكائنات حقيقية النواة يجب أن يحتوى الحامل الذى يحمل الجين المرغوب أو الجين المنقول (T.G.) على بروجينوتور (Promoter) ويجب أن يكون مصدره كائنات غير حقيقية النواة (بروجينوتور بكتيرى) وكذلك التابع النيوكليوتيدى اللازم لإنهاء كل من نسخ الجين وإنهاء الترجمة. وعلى ذلك فإن الجين المكون (Cloned gene) سوف يتم نسخه إلى mRNA والذى يتم ترجمته إلى البروتين المناسب. ومكتبات التعبير الجينى هى فى جوهرها تخليق بروتين معين لكل جين من الجينات المكونه.

ويتم إنشاء مكتبات التعبير الجينى لجينات الكائنات حقيقية النواة باستخدام الجينات المخلقة صناعياً والمعروفة باسم (c-DNA genes) وذلك لضمان أن الجين المكون بالبكتيريا العائله يمثل الجين الحقيقى والخالى من الأنترونات، بينما فى مكتبات التعبير الجينى للكائنات غير حقيقية النواة يستخدم الـ DNA الجينومى مباشرة أو الجينات مباشرة لعدم إحتوائها على الانترونات ويتم بناء وإنشاء مكتبات التعبير الجينى لجينات الكائنات حقيقية النواة باستخدام الجينات المخلقة صناعياً والمعروف باسم c-DNA genes على النحو التالى:

١- عزل جزيئات الـ mRNA الناتجة من نسخ الجين المرغوب من خلايا الكائنات حقيقية النواة عن طريق ربطها بقطعة من الـ DNA تحتوى على عدد من نيوكليوتيدات الثيمين الطرفية (poly T) حيث ترتبط هذه القطعة بجزيئات الـ mRNA فقط وذلك لإحتوائها على الذيل المكون من عديد من نيوكليوتيدات الأدينين (Poly A tail) فى الطرف 3'.

٢- تستخدم جزيئات الـ mRNA التى تم عزلها فى تكوين جزيء هجينى مزدوج الخيط (mRNA/DNA hybrid) بواسطة استخدام إنزيم النسخ العكسى (Reverse transcriptase) والمعزول من جزيئات الرتروفيروس (Retrovirus).

٣- تحويل هذا الجزيء الهجينى (mRNA/DNA hybrid) إلى جزيء مزدوج الخيط من الـ DNA بواسطة كل من إنزيم الـ RNase H وإنزيم البلمرة DNA polymerase I وبذلك يتم تخليق الجين المرغوب (c-DNA)

٤- وصل هذا الجين المخلق صناعياً (c-DNA) بحامل تعبيرى مناسب يحتوى على العناصر سابقة الذكر واللازمة لظهور التعبير الجينى للجين المرغوب.

٥- كلونة الجينات (Cloned genes) المرغوبة بالبكتيريا *E. coli* حيث يظهر التعبير الجينى لها داخل خلايا البكتيريا العائله.

٦- تنمية البكتيريا المكلونه بالجين المرغوب على بيئة آجار لتكوين مستعمرات بكتيرية مكلونه ثم نقل هذه المستعمرات البكتيرية على غشاء نيلون (Nylon membrane) حيث يرتبط البروتين الناتج من التعبير الجينى للجين المكلون بغشاء النيلون، وبعد ذلك يتم تحديد نوع هذه البروتينات بواسطة عديد من الطرق وغالباً تستخدم طريقة الأجسام المضادة (Antibodies) فى التعرف على البروتين من خلال تحضين الأجسام المضادة مع البروتين الناتج .

Features of Expression Vectors

خصائص حوامل التعبير الجينى

نظراً لأن البروتينات الأجنبية التى تنتجها الجينات المكلونه فى البكتيريا *E. coli* وخصوصاً تلك البروتينات التى تنتجها البكتيريا بكميات كبيره يكون لها تأثير سام على البكتيريا *E. coli* نفسها مما يسبب موت الخلايا البكتيرية العائله لذلك يجب تنظيم التعبير الجينى للجينات المكلونه بالبكتيريا عن طريق استخدام حوامل تعبير (Expression vector) تحتوى على:

١- بـروموتور (Promoter) ينظم عمل الجينات المكلونه بحيث تعمل هذه الجينات أو تتوقف عن العمل تحت ظروف معينة بطريقة تسمح للخلية البكتيرية العائله بالنمو وإنتاج البروتين الأجنبى بصورة لا تسبب موت الخلية البكتيرية العائلة. كذلك يجب أن يحتوى البروموتور على العناصر التالية:

أ- موقع ارتباط إنزيم البلمرة RNA polymerase البكتيرى حتى يتمكن هذا الإنزيم

من نسخ الجين المكلون أو الجين المنقول (R.G.)

ب- موقع الاوبريتور (Operator site) حيث يرتبط به البروتين الكابت (R.P.) الذى

ينتجه الجين الكابت.

ج- موقع بداية نسخ الجين المكلون (Transcription start site)

٢- أن تحتوى على الجين الكابت (Repressor gene) والذى ينظم عمل الجين المكلون مثل الجين المنظم لاوبرون اللاكتوز فى البكتيريا *E. coli* وهو الجين (Lac I gene) والذى ينتج مستوى عالى من البروتين الكابت. وباستخدام مثل هذا الجين الكابت (Lac I gene) يجعل الجين المكلون متوقف عن العمل (Switched off) ما لم يضاف المحفز بعد ذلك إلى البيئة الغذائية والذى يحفز نسخ الجين المكلون (Switched on).

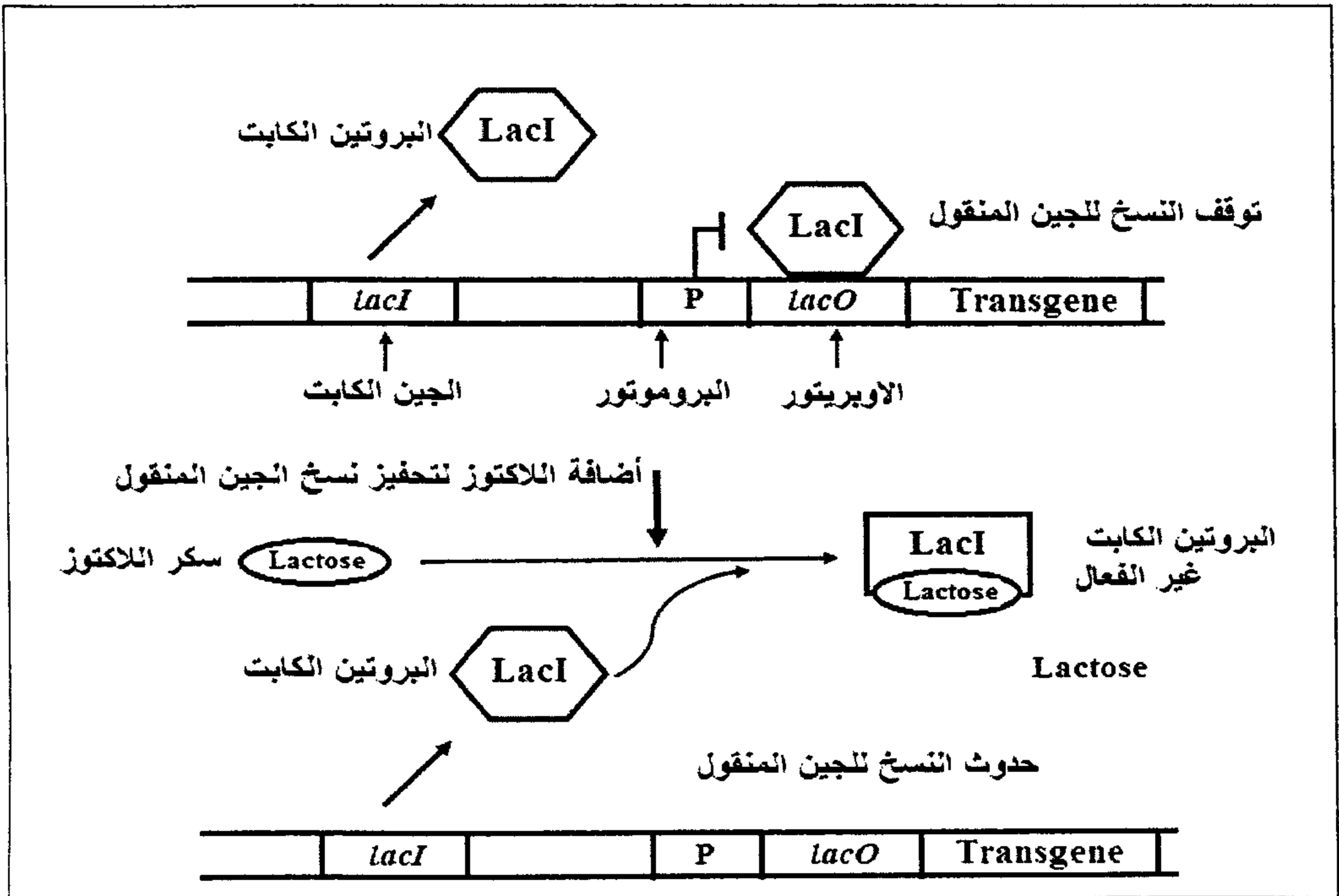
٣- أن تحتوى على منطقة منشأ التضاعف وذلك لتضاعف حامل التعبير داخل الخلية البكتيرية العائلة.

٤- أن تحتوى على أحد جينات المقاومة لأحد المضادات الحيوية البكتيرية كجين مخبر (R.G.) Reporter gene عن الجين المكلون أو الجين المنقول (T.G.) وذلك للمساعدة فى انتخاب البكتيريا المكلونه التى تحمل الجين المنقول (T.G.).

ومن أمثلة هذا الطراز من البروموتور والمستخدم على نطاق واسع فى تنظيم التعبير الجينى للجينات المكلونه هو بـروموتور اوبرون اللاكتوز حيث يتيح هذا البروموتور أعلى مستوى من نسخ الجين المكلون تحت الظروف التحفيزية باستخدام المحفزات والتى تمثل مركبات كيميائية تضاف إلى البيئة الغذائية للبكتيريا المكلونه ويتم تنظيم التعبير الجينى للجينات المكلونه باستخدام هذا النظام على النحو التالى (شكل ٦٢):

أ- فى غياب المحفز يرتبط البروتين الكابت (R.P.) الذى ينتجه الجين الكابت (Lac I gene) بموقع الاوبريتور (Operator) وبالتالي لا يستطيع إنزيم البلمرة (RNA polymerase) نسخ الجين المكلون ويصبح فى صورة متوقف عن العمل (Switched off).

ب- فى وجود المحفز وهو فى هذه الحالة عبارة عن سكر اللاكتوز أو شبيهه (IPTG) إلى البيئه الغذائية يتحرر البروتين الكابت من على موقع الاوبريتور وبالتالي يستطيع إنزيم البلمرة من الاستمرار فى نسخ الجين المكلون ويصبح البروتين الكابت غير قادر على الارتباط بموقع الاوبريتور ويصبح الجين المنقول (T.G.) فى صورته الفعالة وظيفياً (Switched on).



شكل (٦٢): تنظيم التعبير الجينى للجين المنقول Transgene

الباب الثامن

النباتات المعدلة جينياً

Transgenic Plants

Historical View of Plant Breeding

نظرة تاريخية لتربية النبات

قام الإنسان منذ آلاف السنين بتحسين النباتات والحيوانات المستأنسة عن طريق التربية بالانتخاب (Selection breeding) وذلك بالانتخاب للأفضل بالنسبة للإنسان والتي غالباً ما كانت تخضع هذه الطريقة لكل من النجاح والفشل. ومنذ بداية القرن العشرين عرف مربى النبات والحيوان أن هذا التحسين له أساس وراثي ومازال عديد من العلماء يستخدمون طرق التربية التقليدية Traditional Plant Breeding (T.P.B.) المعروفة في الأغراض التالية:

١- زيادة المحصول النباتي.

٢- زيادة المقاومة الوراثية للعديد من الآفات الحشرية والأمراض النباتية.

٣- زيادة تحمل (Tolerance) محصول نباتي معين للظروف البيئية القاسية (Environmental stress) مثل درجات الحرارة المرتفعة أو المنخفضة أو تحمل الإجهاد المائي (Drought tolerance) وكذلك تحمل زيادة الأملاح في التربة (Salinity tolerance).

وعلى الرغم من أن التهجين البسيط بين النباتات عالية المحصول ينتج نسلًا يعطى محصولاً أعلى من الآباء إلا أن هذه الطريقة تحتاج إلى وقت طويل. وعلى الرغم أيضاً من أن بعض الأنواع النباتية يحدث فيها التلقيح الخلطي والذي قد يؤدي إلى اكتشاف أحد النباتات في النسل قد يعطى محصولاً مرتفعاً إلا أن اكتشاف هذه النباتات عالية المحصول يكون محدوداً بكمية التنوع الوراثي (Genetic diversity) الموجودة في الآباء. فإذا أجرى التهجين بين آباء تحمل نفس

الجينات بمعنى عدم وجود اختلافات وراثية فإن كمية التحسين الوراثى تكون محدوده والأكثر من ذلك إذا كان الغرض هو الحصول على نباتات مقاومة وراثياً للآفات الحشرية أو الأمراض النباتية وكانت الآباء المستخدمة فى التهجين لا تحتوى على هذه الجينات التى تسبب صفة المقاومة فإنه لا توجد أى طريقة من طرق التربية التقليدية (T.P.B.) يمكن استخدامها لتحسين صفة المقاومة الوراثية للآفات الحشرية والأمراض النباتية مما يتطلب البحث عن إيجاد الطرق البديلة لتحقيق هذا الغرض.

وفى الثلاثينات من القرن العشرين استخدم العلماء المطفرات الكيميائية (Chemical mutagenesis) بتعريض بذور النباتات لاستحداث الطفرات فى البذور وكذلك استخدام الأشعة السينية (X-rays) وأشعة جاما (Gamma rays). وعلى الرغم من فعالية هذه الطريقة إلا أنه يصعب التنبأ بوجود الصفات المرغوبة والحصول عليها بواسطة طرق التربية التقليدية (T.P.B.). ومع ذلك فإن هذه الطريقة من طرق التربية بالطفرات (Mutation breeding) كانت ناجحة فى نباتات الزينة ونباتات الخضر والفاكهة والمحاصيل الحقلية وأن بعض الأصناف النباتية التى نتناولها كغذاء سواء كانت خضر أو فاكهة تم تحسينها بهذه الطريقة. وتتلخص طريقة التربية بالطفرات فى الخطوات التالية:

١- تعريض عدد كبير من البذور النباتية إلى المطفرات الكيميائية لتوليد الطفرات فى الـ DNA.

٢- زراعة البذور الناتجة من المعاملة بالمطفرات فى الحقل لاكتشاف النباتات أو الثمار أو الأزهار المحسنة على الرغم من أن هذه المعاملة بالمطفرات قد تسبب موت الأجنة فى عدد كبير من البذور المعاملة.

٣- إذا اكتشف النبات الذى يحتوى على الصفة المحسنة يجرى اختبار نسل هذا النبات من حيث تواجد الصفة المحسنة فى هذا النسل من عدمه.

٤- إذا ثبت وجود الصفة المحسنة فى النسل فإن ذلك يؤكد أنها تورث (Heritable) إلى النسل من جيل لآخر.

٥- يجري إكثار هذا النبات المحسن عن طريق الطفرة والذي قد يحتاج إلى فترة طويلة قبل أن يباع هذا الصنف النباتي المحسن في الأسواق على نطاق تجارى.

٦- التأكد من أن هذا الصنف المحسن الجديد والذي يباع في الأسواق على نطاق تجارى لم يتعرض أبداً للمطفرات وحتى وقتنا الحالى تستخدم طريقة التربية بالطفرات مع تطويرها باستخدام وسائل البيولوجيا الجزيئية لتحديد وتعيين الجين الحقيقى المرتبط بالشكل المظهرى (Phenotype) المرغوب.

وحديثاً فتحت تكنولوجيا الـ DNA المعاد توليفه (R.D.T.) Recombinant DNA Technology الباب لإستخدام طرق معرفة وتحديد الجين المرغوب مباشرة واستخدامه فى تحسين النباتات بطريقة مباشرة من خلال نقل الجين (Gene transfer) المرغوب من أى مصدر وإدخاله فى النباتات بواسطة تكنولوجيا الـ DNA المعاد توليفه (R.D.T.) والحصول على نباتات معدلة جينياً (Transgenic Plants (T.G.P.) . وفى وقتنا الحالى تتركز اهتمامات تكنولوجيا الـ DNA المعاد توليفه فى الأهداف التالية:

- ١- إنتاج نباتات معدلة جينياً مقاومة وراثياً للآفات الحشرية.
- ٢- إنتاج أصناف نباتية معدلة جينياً مقاومة وراثياً لبعض مبيدات الحشائش (Herbicide).
- ٣- إنتاج أصناف نباتية معدلة جينياً تتحمل الظروف البيئية القاسية مثل تحمل الإجهاد المائى أو تحمل زيادة نسبة الأملاح فى التربة وكذلك بعض الظروف البيئية القاسية الأخرى مثل ارتفاع درجة الحرارة أو تحمل البرودة.
- ٤- زيادة محتوى المحصول النباتى من بعض الأحماض الأمينية الأساسية الهامة وكذلك بعض الفيتامينات.

وتتلخص الفروق الجوهرية بين طرق التربية التقليدية (T.P.B.) وتكنولوجيا الـ DNA المعاد توليفه (R.D.T.) فى النقاط التالية:

١- مصدر الجين المنقول (T.G.) في تكنولوجيا الـDNA المعاد توليفه إلى النباتات المعدلة جينياً قد يكون من نوع أو جنس نباتي آخر أو حتى من عائلته نباتية أخرى أو قد يكون مصدره من خلية حيوانية أو خلية بكتيرية أو فيروس (Virus). بينما في طرق التربية التقليدية ينحصر نقل الجين في التهجين بين أصناف نفس النوع النباتي (Intraspecific hybridization) أو التهجين بين الأنواع النباتية المختلفة في نفس الجنس (Interspecific hybridization) إذا وجد الجين المرغوب نقله.

٢- يكون الجين المنقول (T.G.) في تكنولوجيا الـDNA المعاد توليفه (R.D.T.) معروف وظيفته وتم كلونته (Cloning) وإكثاره بصورة مكثفة قبل إدخاله في النباتات المعدلة جينياً. بينما في طرق التربية التقليدية نادراً ما يكون معروفاً تحديد الجين المرغوب أو الجين المنقول.

٣- في طريقة تكنولوجيا الـDNA المعاد توليفه يتم نقل الجين إلى النباتات المعدلة جينياً بواسطة جين منقول أو جين أجنبي بطريقة مباشرة بينما في طرق التربية التقليدية يتم نقل هذا الجين المرغوب من أحد الأصناف النباتية إذا وجد هذا الجين بطريقة غير مباشرة.

الوسائل المستخدمة في تكنولوجيا الـDNA المعاد توليفه

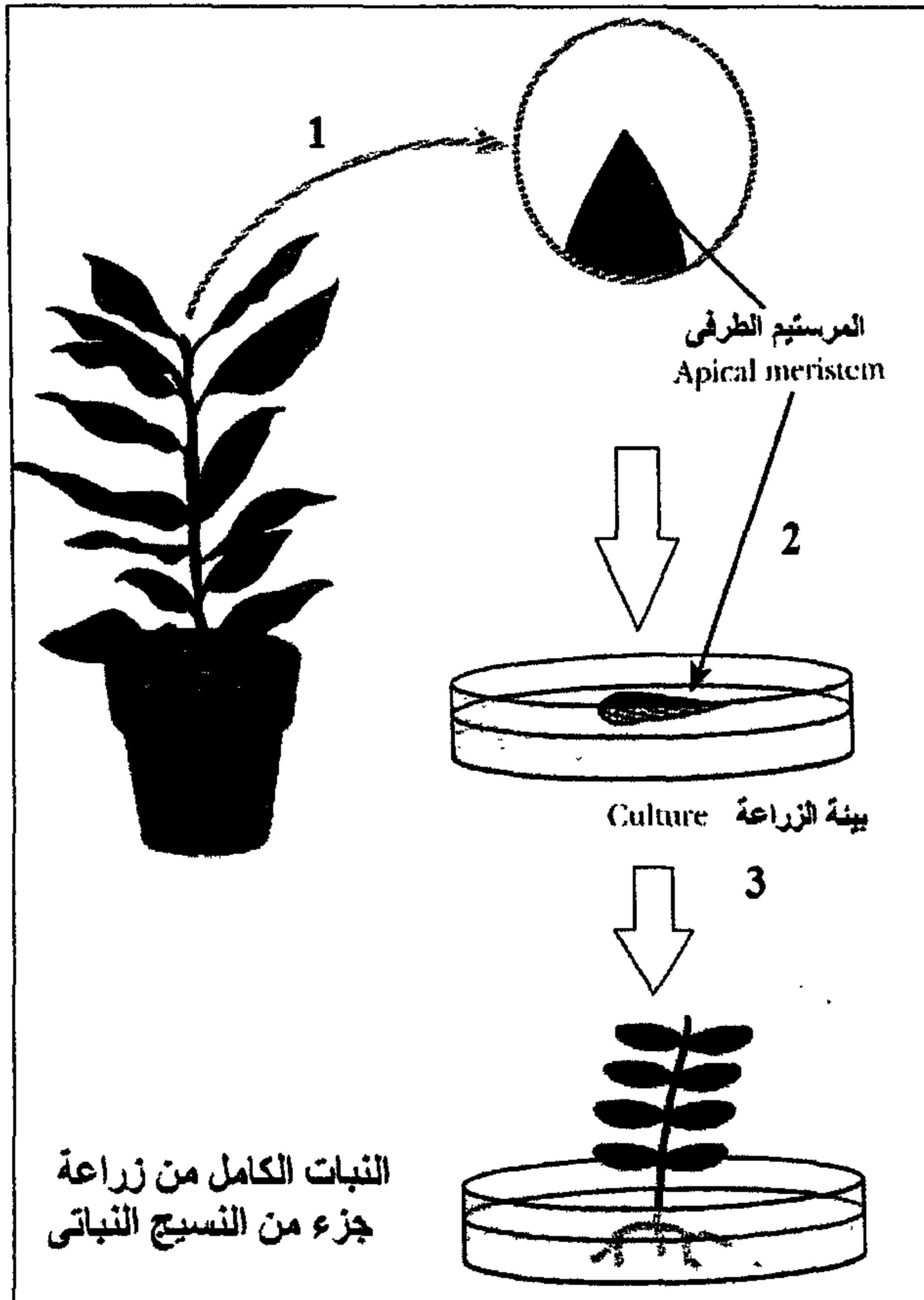
Tools for Recombinant DNA Technology

Plant Tissue Culture

أولاً: زراعة الأنسجة النباتية

من أحد المميزات الرئيسية للنباتات أنها تمتلك القدرة الكامنة (Totipotency) والتي تتمثل في إمكانية الحصول على نبات كامل النمو من إعادة نمو خلية نباتية مفردة أو جزء من النسيج النباتي (شكل ٦٥) بينما لا تمتلك الخلايا الحيوانية هذه القدرة الكامنة. هذه الخاصية الفريدة للنباتات تسمح للعلماء بتتمية الخلايا النباتية في مزارع خلوية (Cell culture) أو مزارع أنسجة (Tissue culture) والتي يحدث لها إعادة نمو لتكوين نبات كامل النمو في هذه المزارع الخلوية أو في مزارع الأنسجة النباتية. وتجرى زراعة الأنسجة النباتية إما على بيئة صلبة

وتسمى بطريقة الكالس (Callus culture) أو على بيئة سائلة وتسمى بطريقة المعلق (Suspension culture). وفي كلا الطريقتين يؤخذ قطعة من النسيج النباتي أو الخلايا والتي تعرف باسم (Explants) من النبات المرغوب إكثاره بطريقة زراعة الخلايا أو الأنسجة.



شكل (٦٣):
يوضح إعادة تكوين
(Regenerated) نبات كامل من
جزء من نسيج نباتي في الخطوات
التالية:
١- أخذ البرعم الطرفي
(Apical meristem) من النبات
الكامل الأصلي.
٢- تنمية هذا البرعم الطرفي على بيئة
غذائية مناسبة تحتوي على الهرمونات
اللازمة لإعادة نمو هذه الخلايا
الموجودة في البرعم الطرفي مرة ثانية.
٣- تكوين نبات جديد كامل النمو.

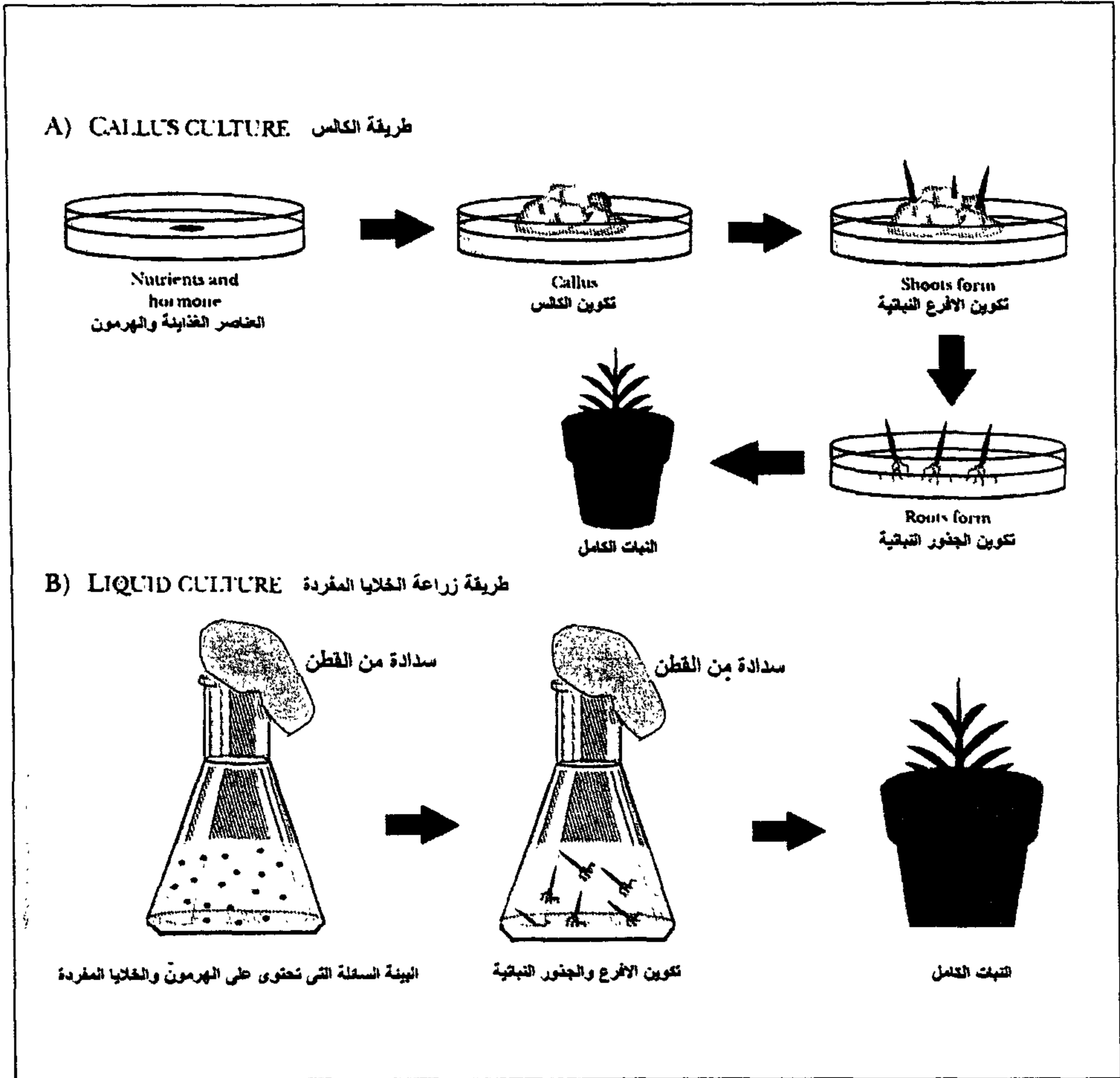
١- طريقة زراعة الكالس (Callus culture)

وفي هذه الطريقة يؤخذ جزء من النسيج النباتي (Explants) من المرستيم الطرفي من
النبات وهي المنطقة من النبات التي ينمو منها الأفرع النباتية الجديدة أو يؤخذ جزء من قمة

الجذر ويوضع على بيئة صلبة حيث تنتج الخلايا النامية وغير المتشكلة (Undifferentiated) طبقة بيضاء على قمة البيئة الصلبة والتي تسمى بالكالس (Callus). وبعد حوالى شهر من النمو تنقل كتلة الخلايا المتكونة وغير المتشكلة إلى بيئة غذائية أخرى تحتوى على تركيز منخفض من هرمون النمو أو إلى بيئة تحتوى على هرمونات مختلفة. ويسمح نقص كمية هرمون النمو لبعض الخلايا غير المتشكلة فى خلايا الكالس بتكوين فرع نباتى (Plant shoot). وفى معظم الحالات تشبه الأفرع النباتية الصغيرة والناجمة من الكالس أوراق النبات الجديدة النامية. وبعد ٣٠ يوم أخرى يزال هرمون النمو تماماً مما يسمح ببداية تكوين الشعيرات الجذرية من بعض الأفرع النباتية النامية وبذلك نحصل على نباتات صغيرة يمكن نقلها للتربة للحصول على نبات كامل (شكل ٦٤).

٢- طريقة المعلق (Suspension culture)

فى هذه الطريقة يجب فصل الخلايا عن بعضها الموجودة فى الجزء المأخوذ من النبات (Explant). وغالباً ما تستخدم الخلايا النباتية التى أزيلت جذرها الجلوية (البروتوبلاست Protoplast) أو خلايا حبوب اللقاح غير الناضجة (Microspores) أو خلايا البويضات غير الناضجة (Macrospores) حيث تنمى هذه الخلايا على بيئة سائلة تحتوى على مخلوط من المواد الغذائية وبعض الهرمونات النباتية الخاصة والتي تحفز الخلايا النباتية غير المتشكلة على النمو (شكل ٦٤) ويلاحظ أنه يحدث نمو لكل من الأنسجة التى تعطى الفرع والجذر النباتى فى نفس الوقت. وتستجيب الأنواع النباتية المختلفة لهرمونات النمو المختلفة بدرجات متفاوتة ، فعلى سبيل المثال تنمو الخلايا والأنسجة النباتية للقمح على بيئة تحتوى على هرمون $2,4, \text{dichlorophenoxyacetic acid}$ (2,4,D) وهو مناهض لهرمون النمو النباتى الأوكسين (Auxin) والذي يقوم بتنبيه الخلايا النباتية للنمو والتشكل بينما فى زراعة خلايا وأنسجة نبات الطماطم يستخدم هرمون السيتوكينين (Cytokinine) والذي يدفع الخلايا إلى الانقسام الخلوى مرة أخرى.



شكل (٦٤): يوضح أن الخلايا النباتية يمكنها أن تستعيد نموها مرة ثانية (Regenerated) لتنتج نبات كامل

A- في زراعة الكالس (Callus culture) تنمو مجموعة من الخلايا غير المتشكلة على سطح البيئة الصلبة (Solid medium).

B- في البيئة السائلة (Liquid culture) تنمو الخلايا المفردة على هذه البيئة السائلة.

وفي كلا الطريقتين يحدث تكوين للأغصان (Shoots) والجذور (Roots) باستخدام التركيزات المناسبة من الهرمونات النباتية للحصول على نباتات كاملة النمو.

ونظراً لإمكانية إكثار النباتات عن طريق زراعة الخلايا أو الأنسجة النباتية فإنه يمكن إنتاج عديد من مئات بل آلاف من النباتات من مصدر واحد وبالتالي يمكن الحصول على سلالة نباتية تسمى بالكلون (Clone) من نبات واحد. وتستخدم هذه الطريقة لإكثار النباتات النادرة والتي تحتاج فقط إلى استخدام جزء صغير من النبات (Explant) لتوليد عديد من مئات النسل المتطابق وراثياً. لذلك يمكن استخدام هذه الطريقة فى إكثار النباتات التى يصعب إكثارها عن طريق البذور. كذلك تستخدم فى طريقة التربية بالمطفرات بدلاً من استخدام البذور وتعريضها للمطفرات بتعريض خلايا الكالس غير المتشكلة إلى المطفرات ثم تنمية هذه الخلايا بعد ذلك للحصول على نباتات كاملة النمو وبذلك تكون المطفرات أكثر فعالية من تعريض البذور للمطفرات. وعلى الرغم من استخدام طريقة زراعة الخلايا والأنسجة بصورة شائعة إلا أنه وجد أن النباتات الناتجة بهذه الطريقة تحتوى على ثلاثة طرز من التحورات أو التغيرات وهى:-

١- تغيرات فسيولوجية مؤقتة حيث وجد أن نباتات التوت البرى (Blueberry) الناتجة من زراعة الأنسجة النباتية كانت أقصر فى الطول كثيراً عن النباتات الناتجة من زراعة البذور ولكن هذه التغيرات ليست دائمة لأنه بعد عدد قليل من السنين من تنميتها فى الحقل تصبح هذه النباتات مشابهة تماماً للنباتات الطبيعية .

٢- تغيرات إبيجينية (Epigenic changes) وتتواجد هذه التغيرات أثناء دورة حياة النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة ولكنها لا تنتقل إلى الجيل الثانى بمعنى أنها لا تورث وغالباً ما ترجع هذه التغيرات إلى حدوث إضافة مجاميع الميثايل إلى الـ DNA.

٣- تغيرات وراثية (Genetic changes) وهى تغيرات وراثية حقيقية تؤثر على النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة وعلى النسل الناتج منها وهذه التغيرات قد ترجع إلى التغير فى مستوى التضاعف الكروموسومى بمعنى حدوث تضاعف الكروموسومات ثلاثة مرات (Triploidy) أو أربعة مرات (Tetraploidy) أو قد ترجع إلى حدوث الطفرات البسيطة أو إلى تنشيط قطع الـ DNA المتنقلة داخل الجينوم أو إلى حدوث تغيرات وراثية فى جينوم (DNA) البلاستيدات الخضراء والميتوكوندريا ولكن باستخدام التغيرات فى مكونات البيئة الغذائية أثناء تنمية زراعة الخلايا والأنسجة يؤدي إلى انخفاض كبير فى معدل الطفرات.

ثانياً: إدخال الجينات فى النباتات باستعمال البلازميد Ti-plasmid

Insertion Gene into Plants Using Ti-plasmid

تعانى بعض الأنواع النباتية من الأورام (Tumors) والتي تختلف تماماً عن الأورام السرطانية (Cancers) فى الحيوانات. وترجع غالبية هذه الأورام إلى البلازميد البكتيرى والمعروف باسم (Ti-plasmid) أو البلازميد المحدث للورم والذي يتواجد فى بكتيريا التربة *Agrobacterium tumefaciens*. ويعتبر هذا البلازميد أحد الوسائل الهامة فى إنتاج نباتات معدلة جينياً (T.G.P.) وخاصة النباتات ذات الفلقتين وذلك بسبب حدوث انتقال طبيعى لقطعة خاصة من هذا البلازميد تعرف باسم (T-DNA) والتي تنتقل من البكتيريا التى تحمل هذا البلازميد إلى الخلايا النباتية بطريقة طبيعية. ولقد أستغل علماء الوراثة الجزيئية هذه الخاصية فى هذا البلازميد (Ti-plasmid) واستخدامه كوسيلة لنقل قطع من الـ DNA (الجينات) إلى نباتات المملكة النباتية فى الوقت الذى يكون فيه هذا الانتقال الوراثى عن طريق التهجين (Hybridization) بين النباتات محدداً بالأنواع قريبة الصلة تماماً من بعضها.

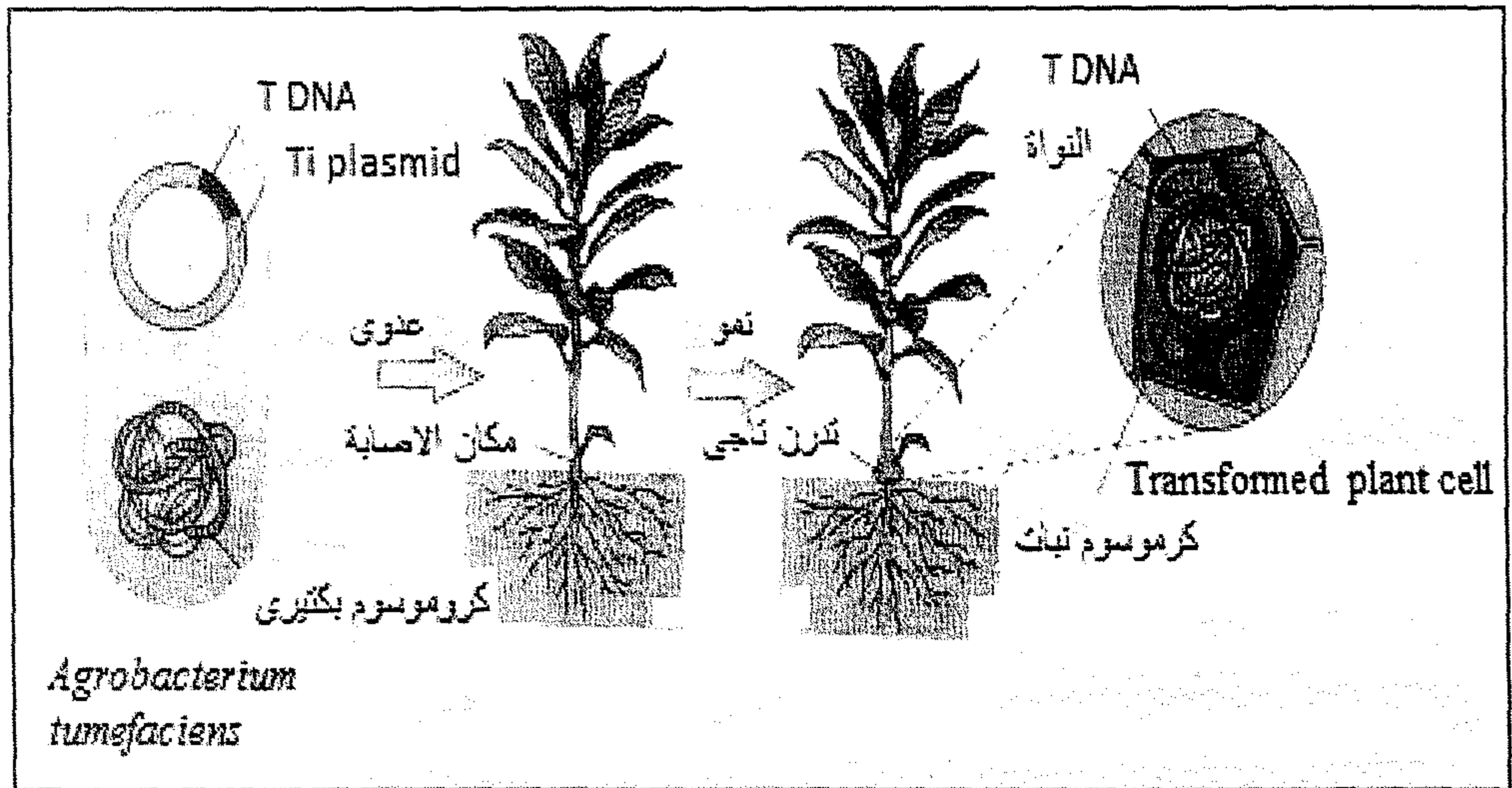
أ- الطبيعة البيولوجية للبكتيريا أجروباكتيريم

تجذب البكتيريا أجروباكتيريم فى الطبيعة إلى النباتات التى بها جروح بسيطة والتي غالباً ما تكون فى منطقة اتصال ساق النبات بالتربة حيث تفرز النباتات المجروحة مركبات فينولية مثل الاسيتوسيرينجون (Acetosyringone) عند مناطق الجروح والتي تجذب البكتيريا إليها حيث تحفز هذه المركبات الفينولية حركة البكتيريا واتصالها بالمناطق المجروحة من النباتات كما تحفز وتنشط التعبير الجينى لجينات العدوى (vir genes) virulence genes والموجودة على البلازميد Ti-plasmid.

ب- الطبيعة الكيميائية للـ Ti-plasmid Chemical Nature of Ti-plasmid

هذا البلازميد من البلازميدات البكتيرية الكبيرة الدائرية (Circular DNA) والذي يحتوى ما بين ١٥٠٠٠٠ إلى ٢٥٠٠٠٠ زوج من النيوكليوتيدات وتحتوى قطعة الـ T-DNA

على ٢٣٠٠٠ زوج من النيوكليوتيدات وتمثل الجينات التى تنتج بعض الهرمونات النباتية مثل السيتوكينين (Cytokinine) والأوكسين (Auxin) والتى بزيادة تركيزها فى الخلية النباتية يدفعها إلى الإنقسام الخلوى المتتالى مكونة الورم المعروف باسم التدرن التاجى (Crown gall) فى منطقة اتصال ساق النبات بالتربة (شكل ٦٥). كما تحتوى قطعة الـ T-DNA على الجينات التى تنتج بعض الأحماض العضوية الشاذة وهى الاوبينات (Opines) مثل الاوكتابين (Octapine) والنوبالين (Nopaline) والتى تستخدمها البكتيريا كمصدر للطاقة كما يحتوى البلازميد Ti-plasmid الجينات اللازمة والضرورية لحدوث العدوى (vir genes) والتى يبلغ عددها ٢٥ جين (25 vir genes) بطول ٣٥٠٠٠ زوج من النيوكليوتيدات ويحد قطعة الـ T-DNA عند طرفيها قطعة من الـ DNA تحتوى على ٢٤ زوج من النيوكليوتيدات تعرف بالحواف (Borders) تمثل المواقع التى يحدث عندها إستئصال قطعة الـ T-DNA (شكل ٦٦)



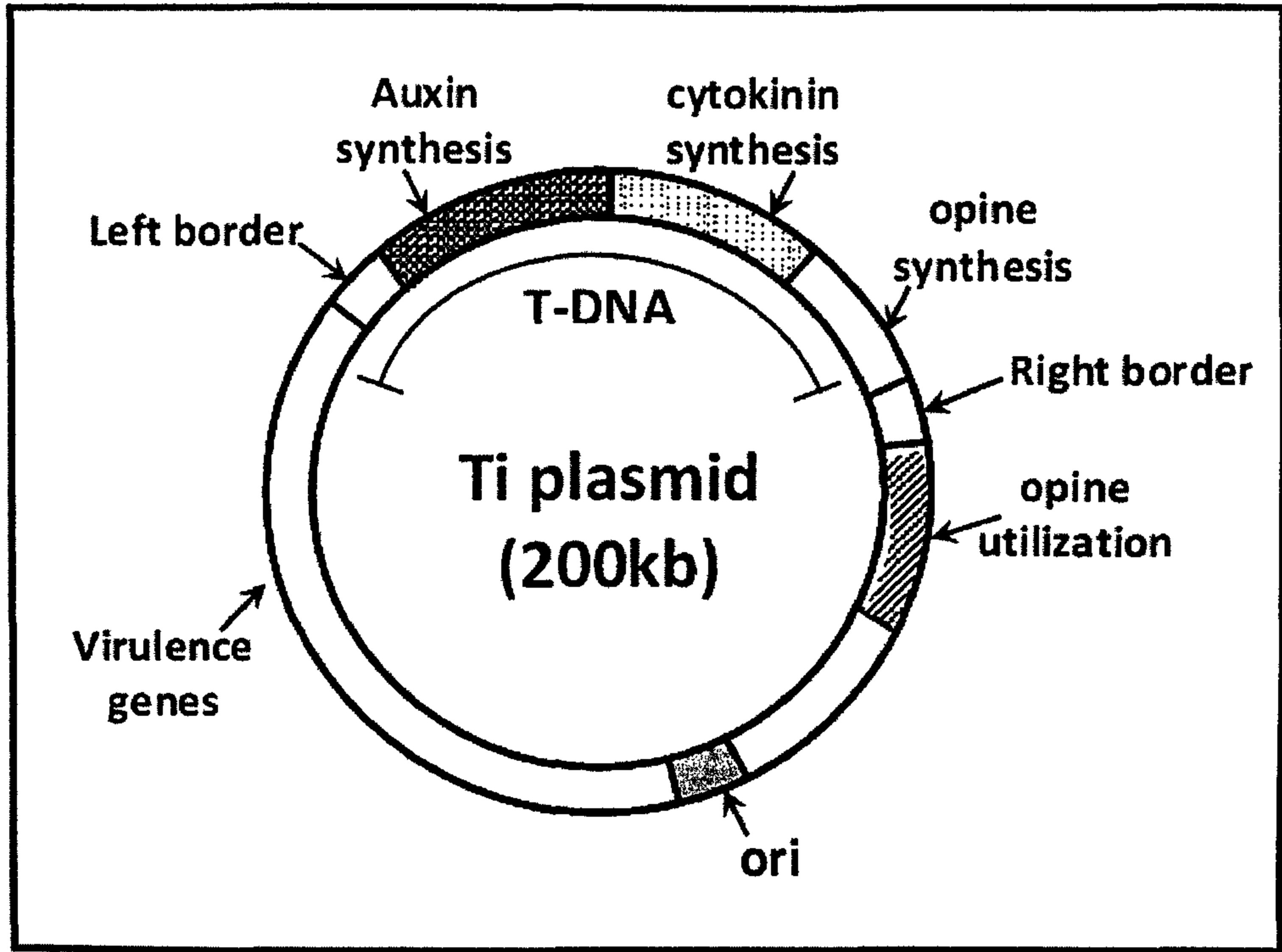
شكل (٦٥): يوضح تكوين ورم التدرن التاجى (Crown gall) :

- ١- يحدث اتصال بكتيريا *Agrobacterium* بالخلايا النباتية فى مناطق الجروح والتى غالباً ما تكون فى منطقة اتصال ساق النبات بالتربة.
- ٢- انتقال نسخة من القطعة T-DNA إلى الخلية النباتية واندماجها فى أحد كروموسومات الخلية النباتية العائلة .

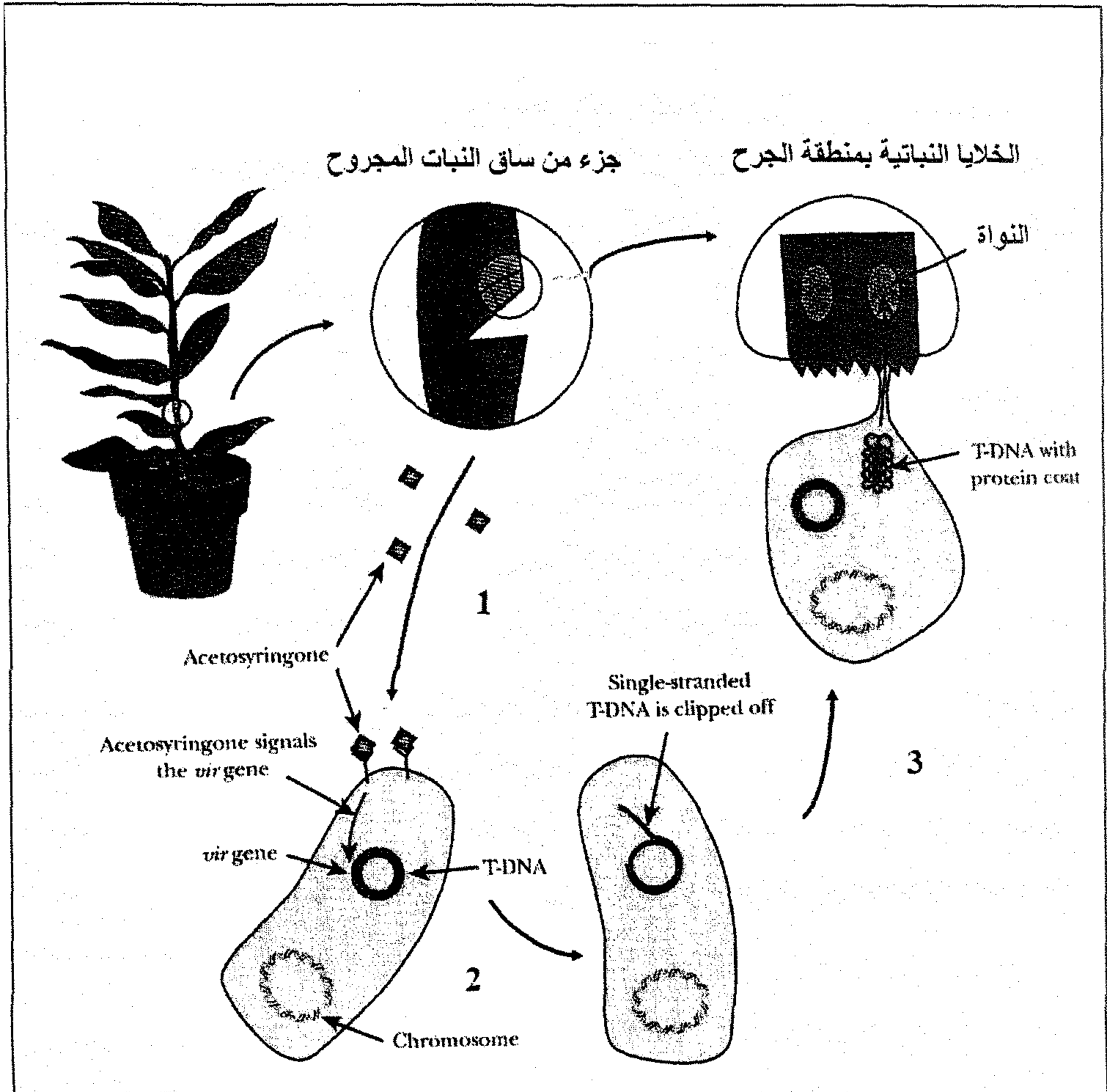
٣- الجينات الموجودة على القطعة T-DNA توجه تكوين الورم (Crown gall) .

وتنتقل قطعة الـ T-DNA خلال مجموعة من الخطوات المعقدة يمكن تلخيصها فيما يلي (شكل ٦٧) :

- ١- تتجذب البكتيريا أجروباكتيريوم إلى مناطق الجروح في النباتات بواسطة بعض المركبات الفينولية والتي تحفز أيضاً بعض جينات العدوى (Vir genes) .
 - ٢- عند سطح الخلية البكتيرية يحدث فسفرة ذاتية للبروتين Vir A و الذى يقوم بنقل الفوسفات إلى البروتين Vir G و الذى يرتبط بالـ DNA لتحفيز نسخ جينات العدوى .
 - ٣- تقوم البروتينات Vir D1 و Vir D2 بقطع خيط مفرد من قطعة الـ T-DNA عند حوافها ثم يرتبط البروتين Vir D2 بالطرف 5' من قطعة الـ T-DNA . تقوم انزيمات الـ Helicases البكتيرية بفك حلزونة قطعة الـ T-DNA من البلازميد Ti و بالتالى تحرر قطعة الـ T-DNA المفردة الخيط من البلازميد ثم يعاد إصلاح تلك الفجوة على البلازميد Ti .
 - ٤- تغطى قطعة الـ T-DNA بالبروتين Vir E2 و تلك هى الصورة التى ينتقل بها إلى الخلية النباتية عبر قناة اتصال (Pilus) بين الخلية البكتيرية والخلية النباتية تتركب من بروتينات تنتجها بعض جينات العدوى .
- وبمجرد أن تصبح قطعة الـ T-DNA جزء من جينوم (DNA) الخلية النباتية يحدث التعبير الجينى للجينات التى تنتج الهرمونات النباتية السيتوكينين والاكسين حيث يسبب هرمون الاوكسين زيادة فى نمو الخلية بينما يقوم هرمون السيتوكينين بدفعها للانقسام الخلوى المتالى والسريع مكوناً الورم المعروف بالتدرن التاجى (Crown gall) . ويرجع السبب فى حدوث التعبير الجينى للجينات الموجودة على قطعة الـ T-DNA داخل الخلية النباتية إلى احتوائها على بروتوتور شبيه ببروموتور الكائنات حقيقية النواة وبذلك لا توجد عقبة أمام التعبير الجينى للجينات الموجودة بقطعة الـ T-DNA داخل الخلية النباتية.



شكل (٦٦) : يوضح مكونات البلازميد Ti-plasmid والقطعة T-DNA التى تنتهى بالحواف (Borders) شمال ويمين قطعة الـ T-DNA والتى تحتوى على جينات تخليق الاوكسين (Auxin) والسيتوكينين (Cytokinin) والابوين (Opine) وهذه الجينات يحدث لها نسخ وترجمة فقط فى الخلية النباتية العائلة وخارج القطعة T-DNA توجد مجموعة جينات العدوى (Vir genes) المتجمعة وكذلك الجين أو الجينات اللازمة لميتابوليزم الابوين وكذلك منطقة منشأ التضاعف origin of DNA replication (Ori) والتى تسمح بتضاعف البلازميد بصورة ثابتة داخل البكتيريا *Agrobacterium tumefaciens*.



شكل (٦٧): يوضح خطوات وآلية انتقال قطعة ال T-DNA من البلازميد Ti-plasmid إلى نواة الخلية النباتية

ج- استخدام البلازميد Ti-plasmid فى إدخال الجين المنقول

Insertion the Transgene into plants using Ti-plasmid

لكى يستخدم هذا البلازميد كوسيلة لنقل الجين المنقول (T.G.) إلى النباتات فإنه يجب إزالة الجينات التى تنتج الهرمونات النباتية من قطعة الـ T-DNA ولذلك لا يستخدم هذا البلازميد مباشرة كوسيلة لنقل وإدخال الجين المنقول إلى النباتات ولكن يجرى عملياً إعادة تكوين بلازميد معاد توليفه من هذا البلازميد (Recombinant Ti-plasmid) والذى يجب أن يحتوى على العناصر التالية بالإضافة لجينات حدوث العدوى *Vir genes* :

١- الجين المنقول (T.G.) والبروموتور الخاص به وهذا البروموتور إما أن يعمل بصورة تحفيزية حيث يجعل هذا البروموتور الجين المنقول إما أن يعمل أو لا يعمل طبقاً لحاجة التعبير الجينى للجين المنقول أو أن يعمل هذا البروموتور بصورة مستمرة حيث يجعل هذا البروموتور الجين المنقول قادراً على أن يظهر تعبيره الجينى فى أى نسيج نباتى وكذلك فى الثمار.

١- الجين المخبر (R.G.) *Reporter gene* وهو الجين الذى يستخدم للكشف عن وجود الجين المنقول من خلال إنتخاب الخلايا التى حصلت على الجين المنقول من باقى الخلايا الأخرى وغالباً ما يكون هذا الجين المخبر (R.G.) هو جين المقاومة لأحد المضادات البكتيرية الحيوية كما يجب أن يحتوى هذا الجين المخبر على البروموتور الخاص به والذى يجب أن يجعل التعبير الجينى للجين المخبر (R.G.) بصورة مستمرة.

ومن الناحية العملية يجرى إحلال هذه المكونات السابقة بدلاً من الجينات الموجودة فى قطعة الـ T-DNA والتى تنتج الهرمونات النباتية وبذلك نحصل على بلازميد معاد توليفه يحتوى على الجينات اللازمة لحدوث العدوى وفى نفس الوقت يحتوى على الجين المنقول (T.G.) والقادر على اظهار تعبيره الجينى فى الخلايا النباتية فضلاً عن إمكانية إنتخاب الخلايا المعدلة جينياً والتى تحتوى على الجين المنقول.

وربما يسبب استخدام الجين المخبر (R.G.) بعض المشاكل بسبب أنه يجب أن يظهر تعبيره الجيني بصورة مستمرة خلال أنسجة النبات ويخشى كثير من المستهلكين من أن البروتين الناتج من الجين المخبر قد يسبب بعض الحساسية أو تفاعلات أخرى إذا ظهر تعبيره الجيني في الحبوب أو الثمار أو الخضراوات للنباتات المعدلة جينياً (T.G.P.) وخاصة عندما يكون الجين المخبر هو جين المقاومة للمضادات البكتيرية الحيوية. ومع ذلك فإنه توجد حالياً من الأنظمة البيولوجية والمتاحة حالياً والتي يمكن إستخدامها في إستئصال وإزالة الجين المخبر من النباتات المعدلة جينياً وسوف نتناول ذلك فيما بعد بالتفصيل.

د- إنتاج نباتات معدلة جينياً بواسطة البلازميد المعاد توليفه

Production of Transgenic plant using Recombinant Ti-plasmid

من الناحية العملية تستخدم البكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* كوسيلة لإدخال الجين المنقول إلى النباتات بإتباع الخطوات التالية (شكل ٦٨):

١- إستخدام مزارع الأنسجة النباتية سواء عن طريق إستخدام بروتوبلاست الخلايا النباتية أو بإستخدام قطع الكالس (Callus) النباتية. ومعاملة أى من البروتوبلاست أو الكالس النباتى بالبكتيريا أجروباكتيريوم التى تحتوى على البلازميد المعاد توليفه والذي يحتوى على الجين المنقول والعناصر الأخرى سابقة الذكر.

٢- تحضين الخلايا النباتية على بيئة النمو فى وجود أحد المضادات البكتيرية الحيوية إذا كان الجين المخبر هو جين المقاومة لأحد المضادات الحيوية أو أحد مبيدات الحشائش (Herbicide) إذا كان الجين المخبر (R.G.) هو جين المقاومة لمبيد الحشائش المستخدم. هذه المعاملة تؤدى إلى موت جميع الخلايا النباتية التى لم تحصل على البلازميد المعاد توليفه وبالتالي لم يحدث لها تحول وراثى وتبقى وتنمو وتستمر فى النمو فقط الخلايا النباتية التى حصلت البلازميد المعاد توليفه وما يحمله من الجين المنقول وهى الخلايا التى حدث لها تحول وراثى.

٣- توجيه الخلايا المعدلة جينياً لإنتاج أفرع (Shoots) نباتية وجذور (Roots) نباتية بتغيير تركيز الهرمونات النباتية فى البيئة الغذائية.

٤- إنتخاب النباتات الصغيرة (Plantlet) والمعدلة جينياً وفحصها وغربلتها من حيث مستوى التعبير الجينى للجين المنقول (T.G.).

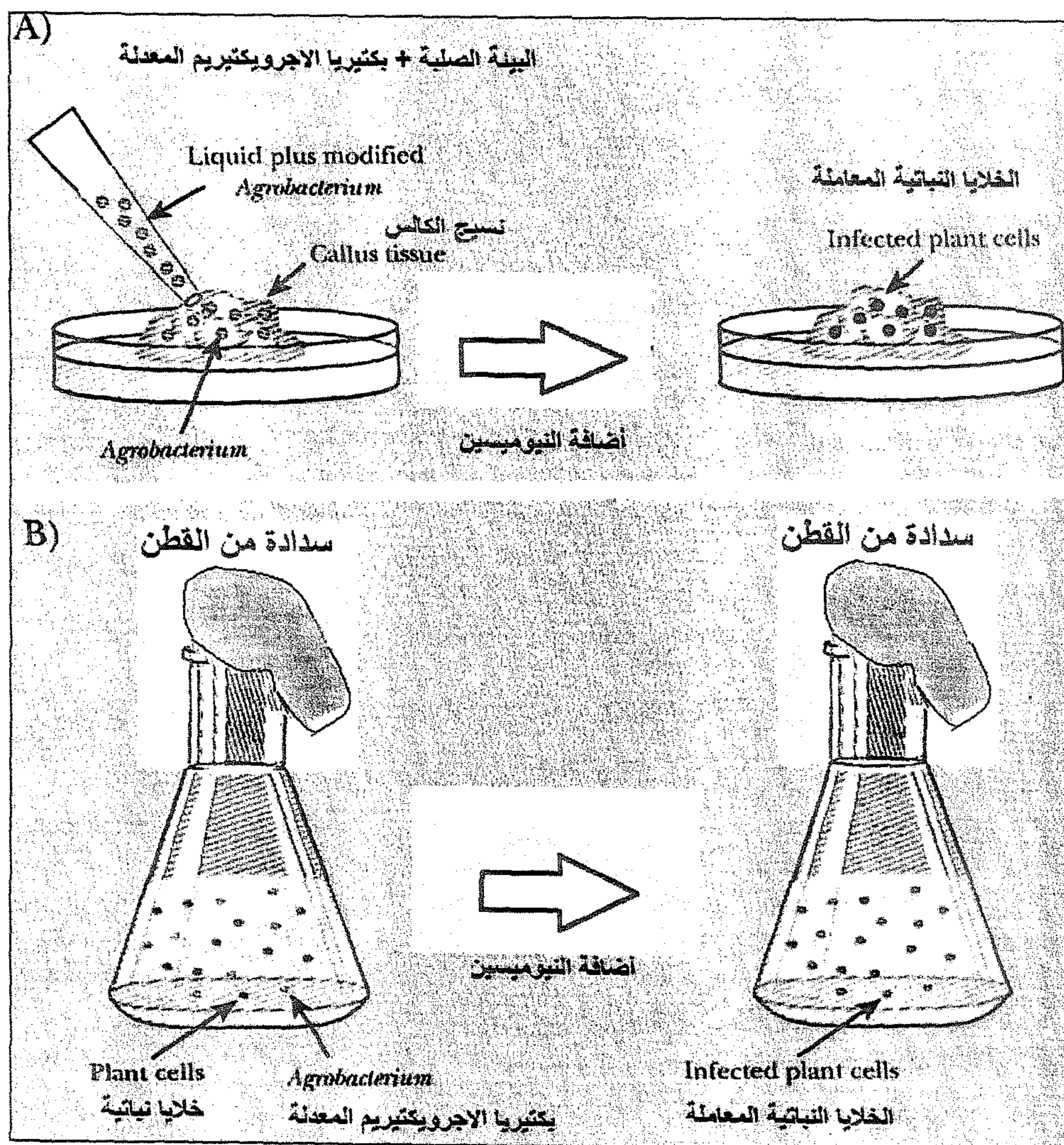
وحديثاً طورت هذه الطريقة والذى أدى إلى ثورة علمية جديدة فى مجال إنتاج النباتات المعدلة جينياً (T.G.P.) بإستخدام النبات النموذجى وهو نبات الارابيدوبسيس (Arabidopsis) كما أمتدت أيضاً إلى نباتات أخرى مثل الذرة والقمح وتتخلص خطوات إستخدام نبات الارابيدوبسيس فى إنتاج النباتات المعدلة جينياً فيما يلى:

١- تنمية نبات الارابيدوبسيس على بيئة غذائية حتى يبدأ تكوين البراعم الزهرية.

٢- أخذ هذه البراعم الزهرية والسماح لها بإعادة نموها على بيئة غذائية لعدة أيام.

٣- بمجرد أن يبدأ إعادة نمو هذه البراعم الزهرية تغمر فى معلق يحتوى على البكتيريا أجروباكتيريم التى تحتوى على البلازميد المعاد توليفه وما يحمله من الجين المنقول والعناصر الأخرى سابقة الذكر، كذلك يحتوى هذا المعلق على Surfactant يسمح للبكتيريا بالإلتصاق بالنباتات النامية وانتقال قطعة الـ T-DNA المعدلة جينياً من البلازميد المعاد توليفه لتصبح هذه القطعة من الـ T-DNA المنقولة جزء من جينوم (DNA) النسيج التناسلى (Germline).

٤- يسمح للنباتات بإستكمال نموها حتى تتكون البذور ثم تحصد هذه البذور ويجرى تنميتها على بيئات غذائية إنتخابية لإكتشاف تلك النباتات المعدلة جينياً (T.G.P.) بإضافة مبيد الحشائش المناسب إلى هذه البيئة الإنتخابية إذا كان الجين المخبر هو جين المقاومة لهذا المبيد وعلى الرغم من أن هذه الطريقة تعطى نسبة منخفضة من النباتات المعدلة جينياً إلا أنه يمكن عزل عديد من البذور التى نجحت فى تحقيق الهدف.



شكل (٦٨): يوضح استخدام البكتيريا أجروباكتيريم *Agrobacterium* كوسيلة لإدخال الجين المنقول (T.G.) إلى النبات حيث تحتوى البكتيريا على البلازميد المعاد توليفه والذي يحتوى على الجين المنقول والجين المخبر (R.G.) وهو جين المقاومة للمضاد الحيوى النيوميسين (Neomycin) حيث تضاف هذه البكتيريا إلى النسيج النباتى (Plant tissue) النامى على البيئة الغذائية ويمكن استخدام كلا من طريقة الكالس (A) او طريقة البيئة السائلة (B) .

ثالثاً: تكنولوجيا أداة القذف Particle Bombardment Technology

من الوسائل العملية الأخرى المستخدمة لإدخال الجين المنقول (T.G.) فى الأنسجة أو الخلايا النباتية هى نفخ (Blast) الجين المنقول أو الـDNA المرغوب خلال الجدر الخلوية النباتية بواسطة أداة قذف دقيقة (Particle gun) وتستخدم هذه الطريقة فى كل الأنواع النباتية المختلفة. والفكرة الأساسية لهذه الطريقة تعتمد على حمل الجين المنقول أو قطعة الـDNA المرغوبة بواسطة جزيئات معدنية ميكروسكوبية والتي تطلق بواسطة أداة قذف فى النسيج النباتى حيث تنفذ هذه الجزيئات من خلال الجدر الخلوية النباتية (شكل ٦٩)

وتستخدم هذه الطريقة بنجاح فى كل الأنواع النباتية وليست متخصصة لنوع نباتى معين كما تستخدم أيضاً فى إدخال الجين المنقول فى الأنسجة الحيوانية للحصول على حيوانات معدلة جينياً (T.G.A. Transgenic animals) وتتلخص إستعمال هذه الطريقة فى الخطوات التالية:

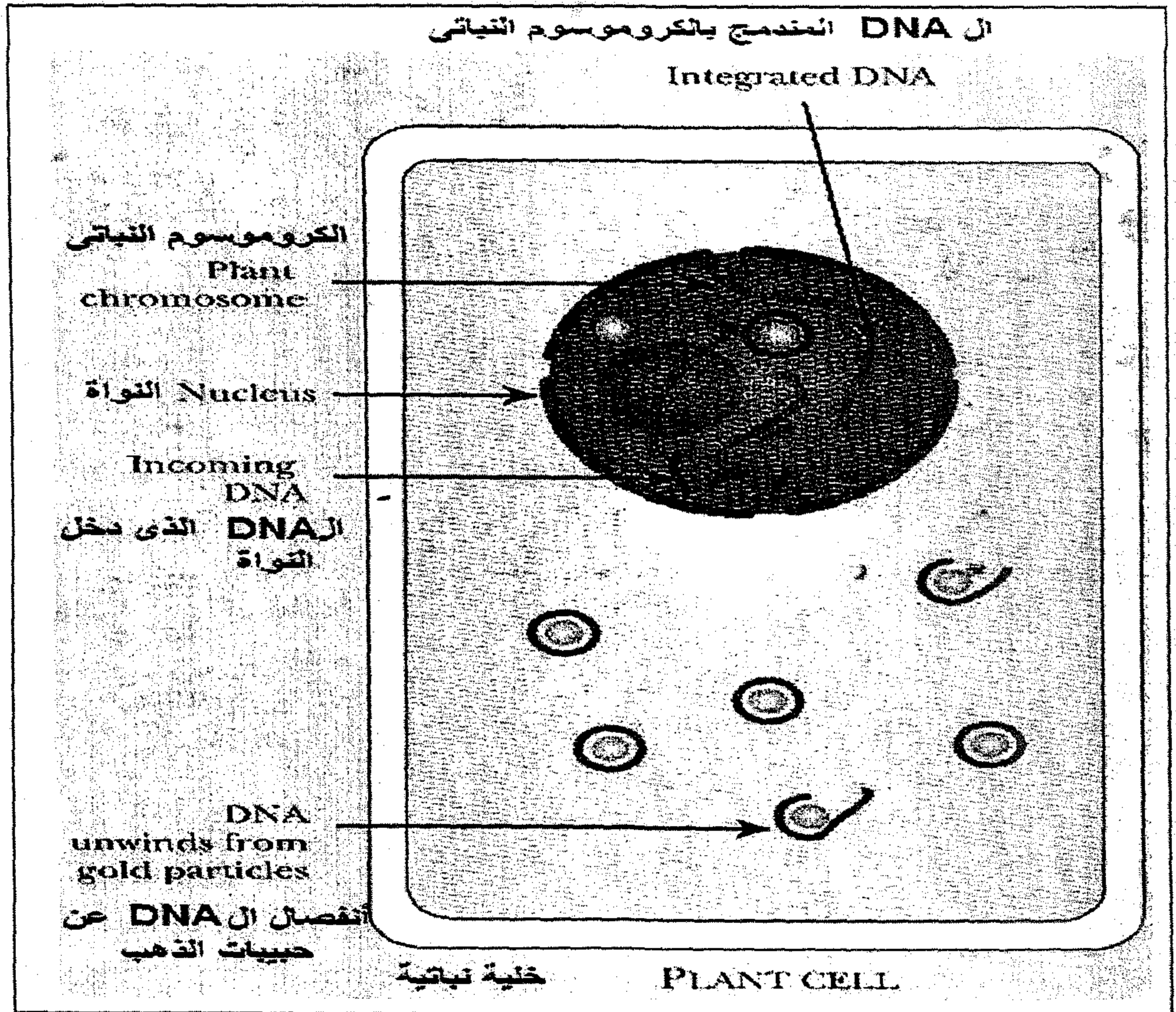
١- عزل قطعة صغيرة من نسيج الأوراق أو قطعة من الكالس (Callus) من النبات تحت الدراسة وتوضع فى طبق بترى (Petri dish) يحتوى على البيئة الغذائية المناسبة ويجرى ذلك فى غرفة زراعة الأنسجة مفرغة الهواء (Vacuum chamber).

٢- تجهيز الجين المنقول بإضافة البروموتور المناسب له وكذلك إضافة الجين المخبر (R.G.) وبعض العناصر المعززة (Enhancers) وهى تتابعات نيوكليوتيدية محددة من الـDNA والتي تعزز التعبير الجينى للجين المنقول (T.G.).

٣- يغلف هذا الجين المنقول بعناصره الأخرى بحبيبات ميكروسكوبية من الذهب (Gold) أو التنجستين (Tungsten) ويفضل استعمال حبيبات الذهب لأن حبيبات التنجستين لها بعض التأثير السام لبعض الأنواع النباتية.

٤- يقذف هذا الجين المنقول بمكوناته فى النسيج النباتى بواسطة تكنولوجيا أداة القذف (Particle bombardment) فى صورة حبيبات.

٥- بعد دخول هذه الحبيبات إلى سيتوبلازم الخلية النباتية ينفصل الجين المنقول من حول حبيبة الذهب الحاملة له وبعد ذلك يدخل الجين المنقول بمكوناته إلى النواة ويحدث له إدماج بنجاح في أحد كروموسومات الخلية النباتية.



شكل (٦٩): استخدام أداة القذف (Particle Bombardment) في قذف حبيبات الذهب للميكروسكوبية الدقيقة والتي تحمل الجين المفقود داخل أحد كروموسومات الخلية النباتية العائلة حيث أنه بعد دخول هذه الحبيبات الخلية العائلة ينفصل الجين المنقول عنها والذي يدخل النواة ويحدث له اندماج بنجاح في أحد كروموسومات الخلية النباتية .

اكتشاف الجين المنقولDetection of Transgene (T.G.)

السؤال الذى يطرح نفسه هو كيف يمكننا اكتشاف ومعرفة الخلايا الهدف التى حصلت على الجين المنقول (T.G.) ؟ . من الناحية العملية يمكن اكتشاف الجين المنقول باضافة الجين المخبر (R.G.) إلى الجين المنقول ومن هذه الجينات المخبره المستخدمه على نطاق واسع ما يلى:

١- الجين المخبر npt (npt Reporter gene) وهذا الجين المخبر ينتج إنزيم نيوميسين فوسفوترانسفيريز (Neomycin phosphotransferase) الذى يثبط نشاط المضاد البكتيرى الحيوى Neomycin باتصاله بمجموعة الفوسفات بالإنزيم وعلى ذلك فإن الخلايا التى حصلت على الجين المنقول والجين المخبر معاً لا تموت عندما يضاف هذا المضاد الحيوى إلى البيئة الغذائية مما يسمح بالانتخاب المباشر لها وبالتالي الحصول على الخلايا المتحولة وراثياً بينما تموت الخلايا الأخرى.

٢- الجين المخبر luc (luc gene) وهذا الجين المخبر ينتج إنزيم ليوسيفيريز (Luciferase) والذى يطلق ضوء عندما تحتوى البيئة الغذائية على مادة تفاعله الليوسيفرين (Luciferine). ويسمى هذا الجين المخبر فى الكائنات حقيقية النواة باسم (luc gene) بينما يسمى باسم (lux gene) فى الكائنات غير حقيقية النواة . وعلى الرغم من أن كلا الإنزيمين اللذان ينتجهما هذين الجينين يطلقان ضوء إلا أن الطبيعة الكيميائية لمادة تفاعلهما الليوسيفرين (Luciferin) مختلفة (شكل ٧٠).

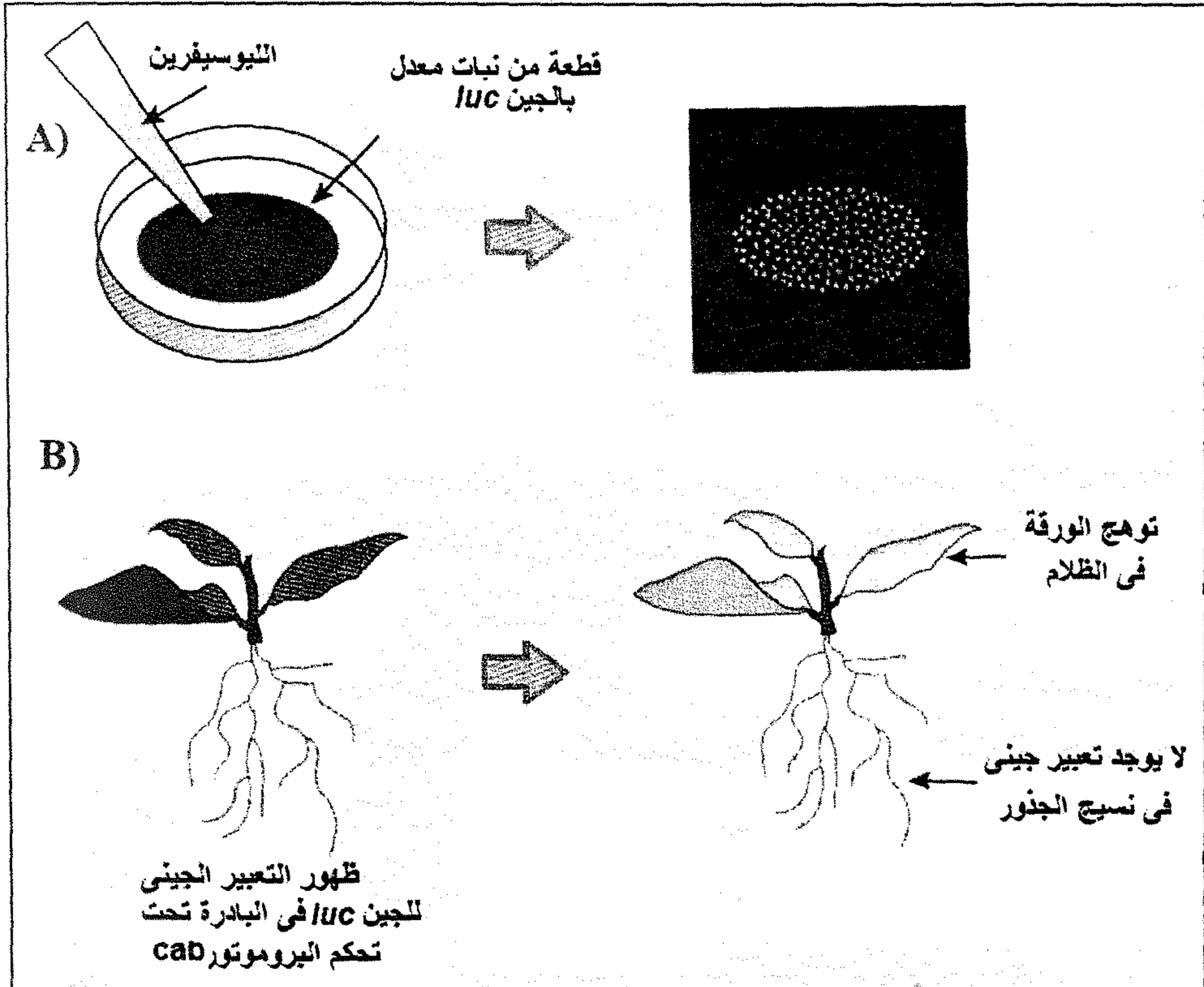
وعند استخدام هذا الجين المخبر سواء الجين (luc gene) أو الجين (lux gene) فإنه إذا تم بنجاح دخول الجين المنقول والجين المخبر إلى الخلية النباتية الهدف يحدث انبعاث للضوء إذا أضيفت مادة تفاعلهما الليوسيفرين إلى البيئة الغذائية، وعلى الرغم من أن مستوى التعبير الجينى لهذا الجين المخبر يكون واضحاً والذى يتمثل فى الإنتاج الكبير لهذا الإنزيم والذى يمكن مشاهدته بالعين المجردة إلا أنه عادة ما تكون كمية الضوء المنبعثة صغيرة والتى يمكن التحقق منها ومشاهدتها باستخدام أجهزة اليكترونية حساسه مثل جهاز Scintillation counter وهو عبارة عن خلية ضوئية حساسه أو بواسطة CCD كاميرا (CCD Camera).

ويمتاز هذا الجين المخبر (R.G.) سواء الجين (*luc gene*) أو الجين (*lux gene*) أن البروتين الذى ينتجه أى من الجينين والذى يتركب منه إنزيم الليوسيفيريز (*Luciferase*) لا يكون ثابت لفترة طويلة فى النبات إلا أن الكمية الفعالة من هذا الإنزيم تتلازم مع مستوى التعبير الجينى لأى من الجينين السابقين عند أى وقت. كذلك يمكن استخدام هذا الجين المخبر لإختبار نشاط بروموتور معين ، فعلى سبيل المثال إذا كان البروموتور *cab* (*Cab promoter*) يتحكم فى التعبير الجينى للجين (*luc gene*) فإن إنزيم الليوسيفيريز سوف ينتج فقط عندما يعمل هذا البروموتور . وعلى ذلك فإن نبات الارابيدوبسيس المعدل جينياً (T.G.P.) والذى يحتوى على الجين المخبر *Luc gene* أو *lux gene* فى وجود البروموتور (*Cab promoter*) سوف ينبعث منها ضوءاً من إنزيم الـ *Luciferase* فى الأنسجة التى يحدث فيها التمثيل الضوئى (*Photosynthesis*) وهى الظروف الطبيعية لتحفيز البروموتور النباتى (*Cab promoter*) وبمجرد النجاح فى الحصول على الخلايا التى ظهر فيها التعبير الجينى لهذا الجين المخبر (R.G.) فإنه يمكن اكتشافها وتنميتها للحصول على نباتات كاملة معدلة جينياً (Transgenic plants (T.G.P.))

Excision of Reporter Gene (R.G.)

استئصال الجين المخبر

من بين أهم مخاوف استخدام تكنولوجيا النباتات المعدلة جينياً (T.G.P.) هى استخدامها للجين المخبر (R.G.) لاكتشاف الجين المنقول (T.G.) وخصوصاً عندما يكون هذا الجين المخبر هو جين المقاومة لأحد المضادات الحيوية وذلك لتخوف عديد من المستهلكين من وجود الجين المخبر فى المواد الغذائية الناتجة من النباتات المعدلة جينياً. ومع ذلك أصبح متاحاً حالياً أنظمة وراثية يمكن استخدامها لاستئصال الجين المخبر (R.G.) بعد إدماج الجين المنقول (T.G.) فى جينوم (DNA) النبات المعدل جينياً ومن بينها النظام المعروف باسم Cre/Lox P. فالبكتريوفاج T₂ يهاجم البكتيريا *E. coli* بصورة طبيعية. وهذا البكتريوفاج يحتوى على نظام بسيط للتوليف الوراثة (Genetic recombination) يعرف باسم Cre / Lox P system والذى يتركب من:



شكل (٧٠): يوضح استعمال إنزيم الـ **Luciferase** المخبر فى الأنسجة النباتية (Plants tissues) الأنسجة النباتية التى تحمل الجين **luc gene** كجين مخبر ينتج الإنزيم **Luciferase** الذى يبعث لون أزرق **blue light** فى البيئة الغذائية عندما توجد مادة تفاعله اللوسيفرين (**Luciferin**):

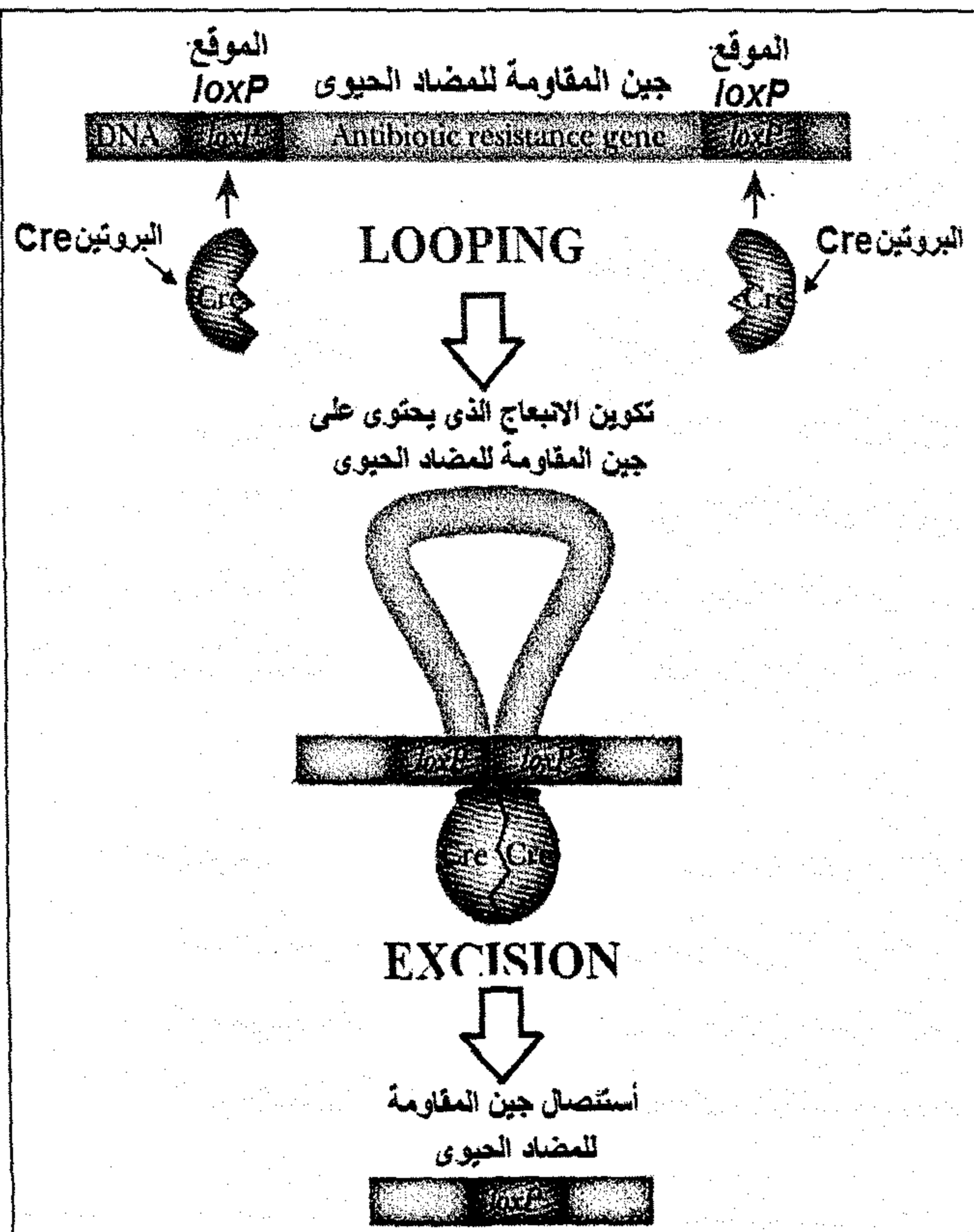
A. الجزء الوسط من ورقة (Leaf disk) نباتات معدلة جينياً (T.G.P.) بالجين **luc gene** المشاهد بالخلاية الضوئية.

B. ظهور التعبير الجينى للجين **luc gene** فى بادره فى وجود البروموتور التحفيزى وهو البروموتور (Cab promoter).

١- الجين Cre والذي يقوم بإنتاج البروتين (Cre) وهو عبارة عن إنزيم ريكمبينيز (Recombinase) الذي يسبب إعادة توليف الـ DNA عند تتابع نيوكليوتيدى معين يعرف باسم Lox P.

٢- التتابع النيوكليوتيدى Lox P والذي يتركب من ٣٤ زوج من النيوكليوتيدات والذي يتعرف عليه البروتين (Cre).

ومن الناحية العملية لإستئصال الجين المخبر (R.G.) من النباتات المعدلة جينياً يجب إضافة الموقع Lox P على جانبى الجين المخبر. وعندما يحدث تنشيط لإنزيم الـ Recombinase فإنه يقوم بتجميع الموقعين Lox P معاً وإزالة الجين المخبر كما هو مبين فى (شكل ٧١).



شكل (٧١):

يوضح استئصال الجين المخبر (Reporter gene) بواسطة النظام cre/lox P system حيث يتعرف إنزيم الـ Recombinase على موقع التعرف lox P على جانبى الجين المخبر ويقوم بتجميع الموقعين lox P (Recombine) معاً واستئصال الجين المخبر.

ولاستئصال الجين المخبر (R.G.) من النباتات المعدلة جينياً فإنه يجب إعادة تكوين البلازميد المعاد توليفه (R.P.) والذي سوف يستخدم فى حمل ونقل الجين المنقول (T.G.) بحيث يجب أن يحتوى على المكونات التالية :

١- الجين المنقول (T.G.) Transgene

٢- الجين المخبر (R.G.) Reporter gene

٣- الموقعين Lox P على جانبي الجين المخبر (R.G.)

٤- المكونات الأساسية الأخرى مثل وجود جينات العدوى (*vir genes*).

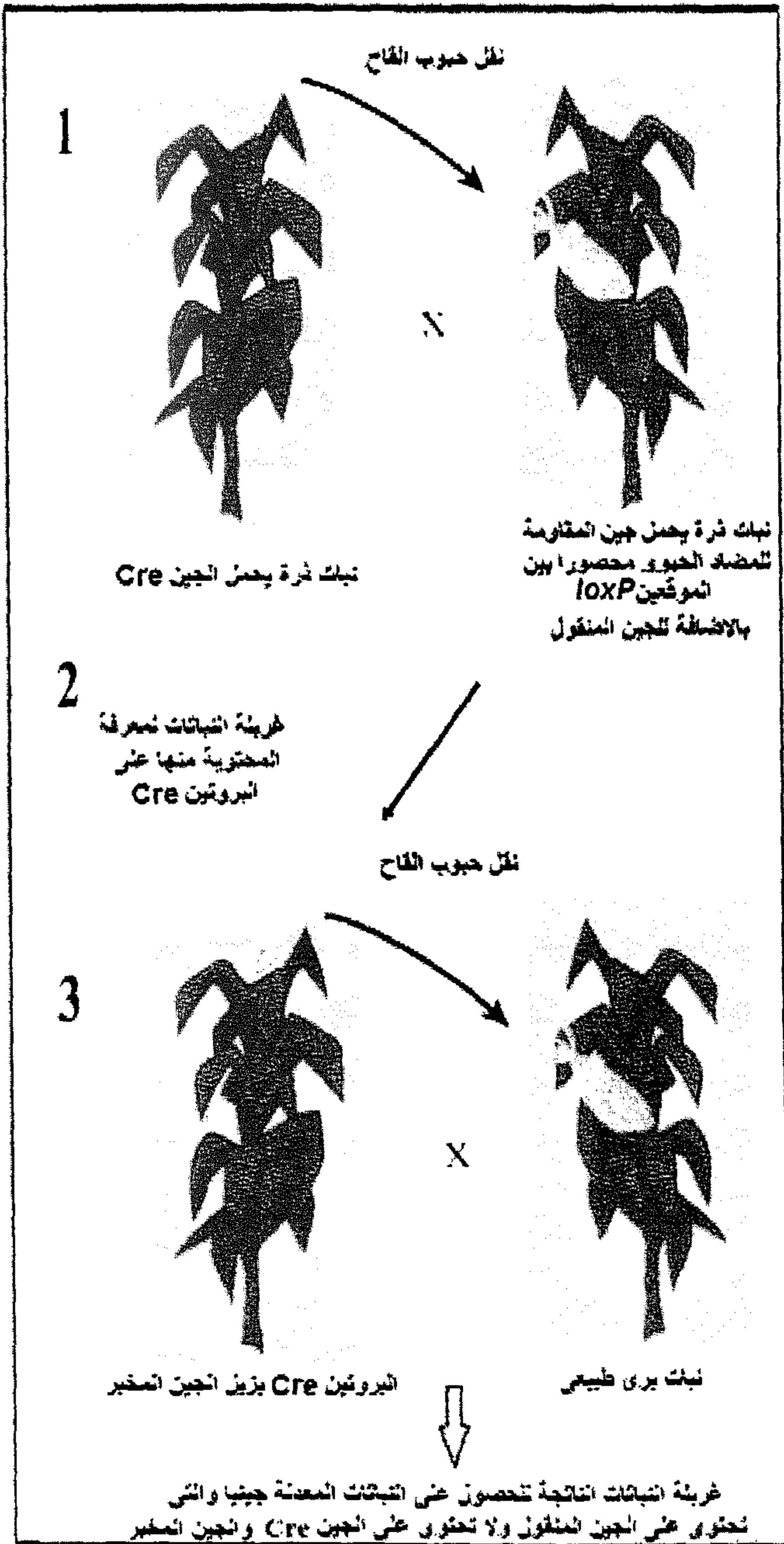
ويجرى إحلال كل من الجين المنقول والجين المخبر والموقعين lox P محل الجينات التى تقوم بإنتاج الهرمونات النباتية الموجودة فى القطعة T-DNA من البلازميد Ti-plasmid وبذلك يحتوى هذا البلازميد المعاد توليفه (R.P.) على كل المتطلبات اللازمة لحدوث العدوى للخلية النباتية وكذلك إنتقال القطعة T-DNA المعاد توليفها بالجينات السابقة بصورة طبيعية إلى الخلية النباتية مما يسبب حدوث التحول الوراثى لها بالجين المنقول وإنتاج نباتات معدلة جينياً تحتوى على الجين المخبر والذي يحدث له استئصال بعد ذلك ويفقد فى السيتوبلازم أو يتم تكسيره أثناء الانقسام الميوزى أو الميوزى وذلك لعدم إحتوائه على منطقة منشأ التضاعف وبذلك نحصل فى النهاية على نباتات معدلة جينياً تحتوى على الجين المنقول فقط. ولإنتاج النباتات المعدلة جينياً والتى لا تحتوى على الجين المخبر يكون باتباع الخطوات التالية (شكل ٧٢):

١- التهجين بين نباتين معدلين جينياً أحدهما النبات الأول والذي يحتوى على كل من الجين المنقول والجين المخبر والموقعين Lox P على جانبي الجين المخبر فى أحد كروموسومات هذا النبات والنبات الثانى يحمل الجين Cre الذى ينتج إنزيم الريمبينييز والذي تؤخذ منه حبوب اللقاح وتوضع على مياسم النبات الأول.

٢- تزرع البذور الناتجة من هذا التهجين وتختبر النباتات الناتجة لمدى حساسيتها للجين المخبر (R.G.) والذي قد يكون جين المقاومة للمضاد الحيوى النيوميسين (neo gene).

٣- إذا وجد البروتين (Cre) فى أحد نباتات النسل فإن الجين المخبر سوف يحدث له استئصال وسوف يفقد أثناء النمو. هذا النبات ينتج حبوب لقاح تحتوى على الجين المنقول والجين Cre ولكنها لا تحتوى على الجين المخبر وهو جين المقاومة للمضاد الحيوى (neo gene)

٤- إذا أجرى تلقيح آخر بين هذا النبات المعدل جينياً ونبات طبيعى (Wild-type) فإن بعض النسل الناتج سوف يحتوى على الجين المنقول ولكن ينقصه الجين (Cre) وباستخدام طريقة وراثية مثل التى تضمن أن النبات النهائى المعدل جينياً سوف يحتوى على نسخة واحدة (One copy) من الجين المنقول فإنه يمكن تحقيق هذا الهدف النهائى وهو الحصول على نبات معدل جينياً يحتوى على الجين المنقول فقط. ولقد ثبت أن هذه الطريقة أكثر سهولة ومفيدة وبالتالي فإن أى صنف نباتى جديد معدل جينياً والذي سوف يباع فى الأسواق على نطاق تجارى سوف يحتوى فقط على جين منقول واحد وهو الجين المرغوب.



شكل (٧٢):
يوضح طريقة التلقيح
Cross- pollination scheme
لإزالة الجين المخبر (R.G.) غير
المرغوب:

١- تؤخذ حبوب لقاح من النبات الذى يحمل الجين Cre gene وتوضع على مياسم النبات المعدل جينياً والذي يحتوى على الجين المخبر وهو جين المقاومة للمضاد الحيوى.

٢- ظهور البروتين cre protein فى النسل الناتج سيؤدى لاستئصال (Excision) الجين المخبر.

٣- هذه النباتات التى فقدت الجين المخبر تلقح بنباتات بريّة (Wild-type plants) وسوف يحدث الانعزال المنطلى الطبيعى فى النسل وبالتالي سوف يحتوى بعض النسل الناتج من هذا التلقيح على الجين cre gene والبعض الآخر من النسل سوف لا تحتوى على الجين cre gene وهذه النباتات يحافظ عليها لاستعمالها بعد ذلك.

تربية النباتات المعدلة جينياً واختبارهاPlant Breeding of Transgenic Plants and Testing

تعتبر خطوة الحصول على نباتات معدلة جينياً (T.G.P.) خطوة صغيرة نسبياً بالمقارنة للخطوات التى يتم من خلالها تربية وتقييم النباتات المعدلة جينياً حيث تستغرق وقتاً طويلاً ويرجع ذلك للأسباب التالية:

١- إختلاف مستوى التعبير الجينى للجين المنقول (T.G.) والذي يعتمد على عدد الجينات المنقولة فقد تحتوى النباتات المعدلة جينياً على عديد من النسخ لنفس الجين .

٢- موقع الجين المنقول فى الجينوم (DNA) النباتى والذي يؤثر كثيراً على التعبير الجينى له. فإذا حدث إدماج للجين المنقول فى منطقة هتروكروماتين من الكروموسوم النباتى فإنه يوجد احتمال كبير أن يكون هذا الجين المنقول ساكن ولا يحدث له تعبير جينى حتى ولو كان مزوداً ببروموتور قوى بينما إذا حدث إدماج للجين المنقول بالقرب من جين كروموسومى نشط فإنه من المحتمل أن يبدى أعلى مستوى من التعبير الجينى. كذلك يجب الأخذ فى الاعتبار عند تقييم النباتات المعدلة جينياً النقاط التالية:

١- هل يسبب الجين المنقول (T.G.) تأثيرات ضاره جانبية على النبات المعدل جينياً؟

٢- هل يعمل الجين المنقول كما هو متوقع؟

٣- هل يؤثر الجين المنقول على البيئة الطبيعية (Ecosystem)

والإجابة على هذه الأسئلة تعتمد على كل جين منقول بصورة فردية. وإذا لم توجد أى تأثيرات ضارة جانبية فإنه تجرى الخطوات الطويلة فى تربية النباتات المعدلة جينياً ونقل الجين المنقول من النبات التجريبي إلى نبات آخر يعطى محصولاً مرتفعاً. ونظراً لأن معظم الأبحاث التى تجرى لإنتاج نباتات معدلة جينياً تستخدم الأصناف النباتية القديمة والتى تعتبر جيدة فى استخدامها معملياً إلا أنها لا تنتج كميات كبيرة من البذور فى وحدة المساحة (هكتار) أو أنها

تكون شديدة القابلية للإصابة بالأمراض النباتية والأكثر من ذلك كما ناقشنا سابقاً أن إكثار النباتات المعدلة جينياً عن طريق زراعة الأنسجة ربما تسبب بنفسها حدوث الطفرات فى الجين المنقول وللتغلب على كل هذه العقبات فإنه يجب تربية النباتات المعدلة جينياً بواسطة طرق التربية التقليدية والتي من خلالها يتم نقل الجين المنقول من النبات التجريبي المعدل جينياً إلى أصناف نباتية عالية المحصول والتي تستخدم بالفعل على نطاق تجارى بإتباع الخطوات التالية:

١- تؤخذ حبوب اللقاح من النبات التجريبي المعدل جينياً والذي يحتوى على الجين المنقول وتوضع على مياسم نباتات صنف يعطى محصولاً مرتفعاً.

٢- تحصد وتجمع البذور الناتجة من التلقيح السابق ثم يجرى زراعتها لإنتاج نباتات الجيل الأول F_1 .

٣- إنتخاب النباتات التى تحتوى على الجين المنقول فعلى سبيل المثال إذا كان الجين المنقول يجعل النباتات مقاومة لأحد مبيدات الحشائش (Herbicide) فإنه يجب رش نباتات الجيل الأول (F_1) بهذا المبيد والذي يسبب قتل النباتات غير المعدلة جينياً بينما تبقى وتعيش النباتات المعدلة جينياً.

٤- تستخدم طريقة التربية الرجعية (Backcross breeding) باستخدام حبوب لقاح من نباتات الجيل الأول F_1 وتلقيحها عكسياً (backcross) بالأب الأصلي الذى يعطى محصولاً مرتفعاً.

٥- زراعة البذور الناتجة من التلقيح السابق وإنتخاب النباتات التى تحتوى على الجين المنقول بنفس الطريقة السابقة وتعرف هذه النباتات بالجيل الثانى (F_2).

٦- تتكرر خطوات التلقيح الرجعى إلى الأب الأصلي مرتفع المحصول بكل خطواتها لمدة أربعة أو خمسة سنوات وبهذه الطريقة من التربية الرجعية سوف نضمن أن حوالى ٩٨% من الجينات الموجودة فى النبات النهائى والمعدل جينياً هى جينات الأب الأصلي مرتفع المحصول بينما باقى الجينات تكون من النبات التجريبي المعدل جينياً.

ونظراً لأن هذه الطريقة من التربية تأخذ كل الصيف لكل جيل بالنسبة لكل من نبات الذرة وفول الصويا والقطن ولذلك فإنها تستغرق عدد من السنين يصل إلى ستة سنوات لإتمامها. وبمجرد الإنتهاء من طريقة التربية الرجعية ونقل الجين المنقول للصنف المناسب تجرى الاختبارات الحقلية لتقييم تأثير الجين المنقول على النمو وكمية المحصول وبعض الصفات الهامة الأخرى وكذلك المقاومة للأمراض النباتية . ويجب أن تجرى هذه الاختبارات الحقلية لعدد من السنين وفي مناطق مختلفة جغرافياً من حيث طبيعة التربة وطريقة الري سواء بالطريقة العادية أو باستخدام مياه الأمطار . وهذه الاختبارات الحقلية تأخذ أيضاً عدد من السنين وفي نهاية المطاف يقوم مربى النبات بانتخاب النباتات التى تعطى أعلى محصول وأكثرها مقاومة للآفات الحشرية والأمراض النباتية وتستبعد النباتات الأخرى ولا تزرع مرة ثانية.

وقبل تداول واستعمال الأصناف النباتية الجديدة والمعدلة جينياً (T.G.P.) على نطاق تجارى يجب اعتمادها من الهيئات والمؤسسات العلمية الحكومية والتي تنظم كل مراحل عمليات إعادة بناء هذه الجينات المنقولة حيث تنظم الهيئة الدولية للأمان الحيوى (International committee for biosafety) كيفية تداول (Manipulation) الجينات المنقولة عند تكوين النباتات المعدلة جينياً سواء عن طريق البكتيريا أجروباكتيريوم *Agrobacterium* أو البكتيريا *E. coli* أو عن طريق النبات نفسه وعادة ما تكون هذه الهيئة على اتصال بالجامعات والشركات التى تجرى بها إنتاج النباتات المعدلة جينياً وكل هذه الهيئات يتابعها المعهد الدولى للصحة العامة (International Institute of Health) والذي يحدد البيئة التى تجرى فيها تنمية النباتات المعدلة جينياً سواء كانت معامل أو صوب نباتية ولإجراء الاختبارات الكلية على النباتات المعدلة جينياً فإنه يجب أن يوافق على خطة هذه الاختبارات الحقلية مؤسسة الخدمة التفيتيشية لصحة الحيوان والنباتات فى الولايات المتحدة (Animal and Plant Health Inspection Service of the U.S.) كذلك يجب أن يقدم العلماء بيانات ومعلومات كاملة ومكثفة عن الجين المنقول (T.G.) وتأثيره الكامن (Potential effect) على النبات وعلى النظام البيئى (Ecosystem) وتوجد هيئتين أخرتين يجب أن توافق على

النباتات المعدلة جينياً. فإذا كانت النباتات المعدلة جينياً تنتج ناتج غذائى مثل الذرة فإن هيئة الغذاء والدواء (Food and Drug Administration) يجب أن تجرى اختبارات صارمة من حيث الحساسية التى قد تسببها النباتات المعدلة جينياً كذلك تقوم هيئة حماية البيئة (Environmental Protection Agency) أيضاً بتقييم النباتات المعدلة جينياً من حيث تأثيراتها الكامنة على البيئة والحيوانات والحشرات التى تعيش فى حقول الفلاحين.

النباتات المعدلة جينياً والمقاومة لمبيد الحشائش

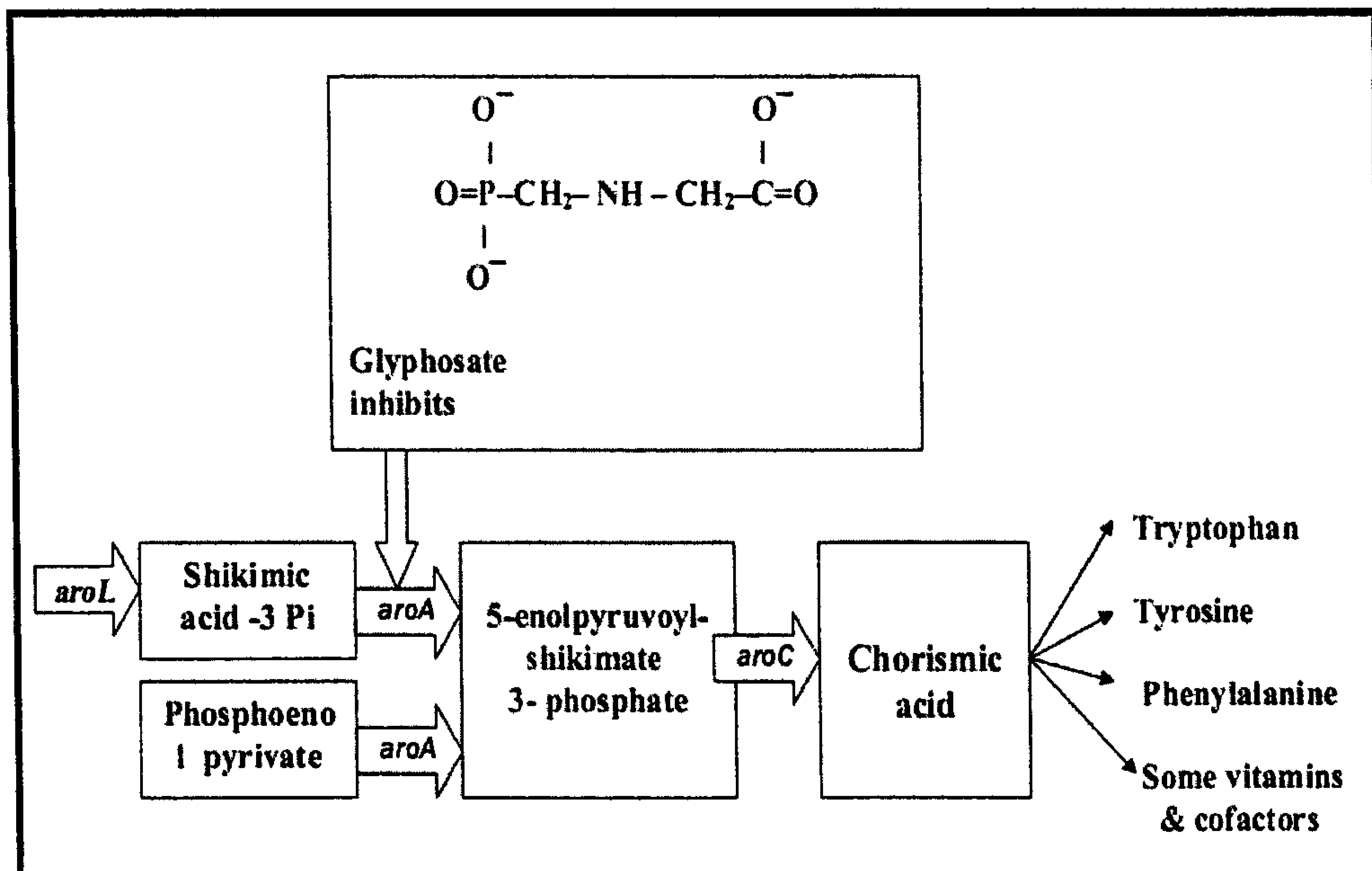
Transgenic Plants with Herbicide Resistance

تكلف مبيدات الحشائش الكيميائية الفلاحين فى العالم أكثر من ٢ بليون دولار سنوياً وبالرغم من ذلك يفقد ١٠% من المحصول بسبب الحشائش وأحد المشاكل التى تواجه استخدام مبيدات الحشائش الكيميائية أنها لا تميز بين نباتات المحصول النباتى والحشائش وبالتالي فإنها تقتل أى نبات تلامسه ومن بين أحد الحلول المستخدمة هو جعل نباتات المحصول النباتى مقاومة وراثياً لمبيد الحشائش.

ومن أفضل مبيدات الحشائش الموجودة فى الأسواق هو مبيد الجليفوسات (Glyphosate) والذى تنتجه شركة (Monsante) تحت اسم تجارى Round-up. وهذا المبيد صديق للبيئة لأنه سريعاً ما يتحول أو يتكسر فى البيئة إلى مركبات غير سامة. وجزئ الجليفوسات هو أحد مشتقات الأحماض الأمينية الشبيهة بالجليسين (Glycine). وهذا المبيد يسبب قتل النباتات عن طريق قفل أو تثبيط الممر التخليقى الحيوى للأحماض الأمينية الأروماتية وهى الفينيل الانين (Phenylalanine) والتيروسين (Tyrosine) والتربتوفان (Tryptophan) (شكل ٧٥).

ويثبط هذا المبيد أحد الإنزيمات الخاصة فى هذا الممر التخليقى الحيوى وهو إنزيم 5-Enolpyruvoyl Shikimate-3-Phosphate Synthase (EPSPS) والذى يتواجد فى البلاستيدات الخضراء وهذا الإنزيم (EPSPS) ينتجه الجين (aro A gene). ويوجد هذا الإنزيم بصورة طبيعية فى النباتات والفطريات والبكتيريا ولكنه لا يوجد فى الخلايا الحيوانية ، وعلى

ذلك فإن هدف هذا المبيد هو هذا الإنزيم والذي لا يوجد في الحيوانات ومنها الإنسان ولذلك يجب أن يتناول الإنسان وكذلك الحيوانات الأخرى هذه الأحماض الأمينية الأروماتية السابقة في طعامهم لأنها لا تستطيع تخليقها.



شكل (٧٣): يوضح تثبيط مبيد الحشائش الجليفوسات Glyphosate لإنزيم الـ EPSPS في الممر التخليقي الحيوي للأحماض الأمينية الأروماتية

وعند رش النباتات بمبيد الجليفوسات فإنه يدخل إلى البلاستيدات الخضراء ويرتبط بإنزيم EPSPS ويقفل الممر التخليقي الحيوي لتخليق الأحماض الأمينية الأروماتية وبالتالي تجوع النباتات بصفة أساسية حتى تموت. ونظراً لأن تحسين مقاومة النباتات بطريقة مباشرة لهذا المبيد هي عملية صعبة أتخذ العلماء طرق أخرى مختلفة. ونظراً لأن هذا الإنزيم (EPSPS) يوجد في

البكتيريا أيضاً إتجه العلماء لإكتشاف إنزيم الـ EPSPS مقاوم لتأثير مبيد الجليفوسات ولكنه فى نفس الوقت يظل قادر على تخليق الأحماض الأمينية الأروماتية على النحو التالى :

١- عزل سلالة طفرية من البكتيريا *Agrobacterium* مقاومة لتأثير مبيد الجليفوسات بطريقة مباشرة عن طريق تنمية هذه البكتيريا على بيئة غذائية تحتوى على هذا المبيد. هذه السلالة الطفرية من البكتيريا *Agrobacterium* تحتوى على إنزيم الـ EPSPS المقاوم لتأثير المبيد ولكنه ما يزال فعال وظيفياً. ووجد أن هذا الإنزيم الطافر يختلف عن الإنزيم الطبيعى فى إحلال حامض أمينى واحد. وهذا الجين الطافر هو نسخة معدلة من الجين (aro A gene).

٢- استخدام البلازميد البكتيرى Ti-plasmid كوسيلة لنقل وإدخال هذا الجين الطافر (aro A gene) للنباتات عن طريق إعادة توليف هذا البلازميد وتكوين بلازميد معاد توليفه (R.P.) يحتوى على (شكل ٧٤)

أ- الجين الطافر (aro A gene)

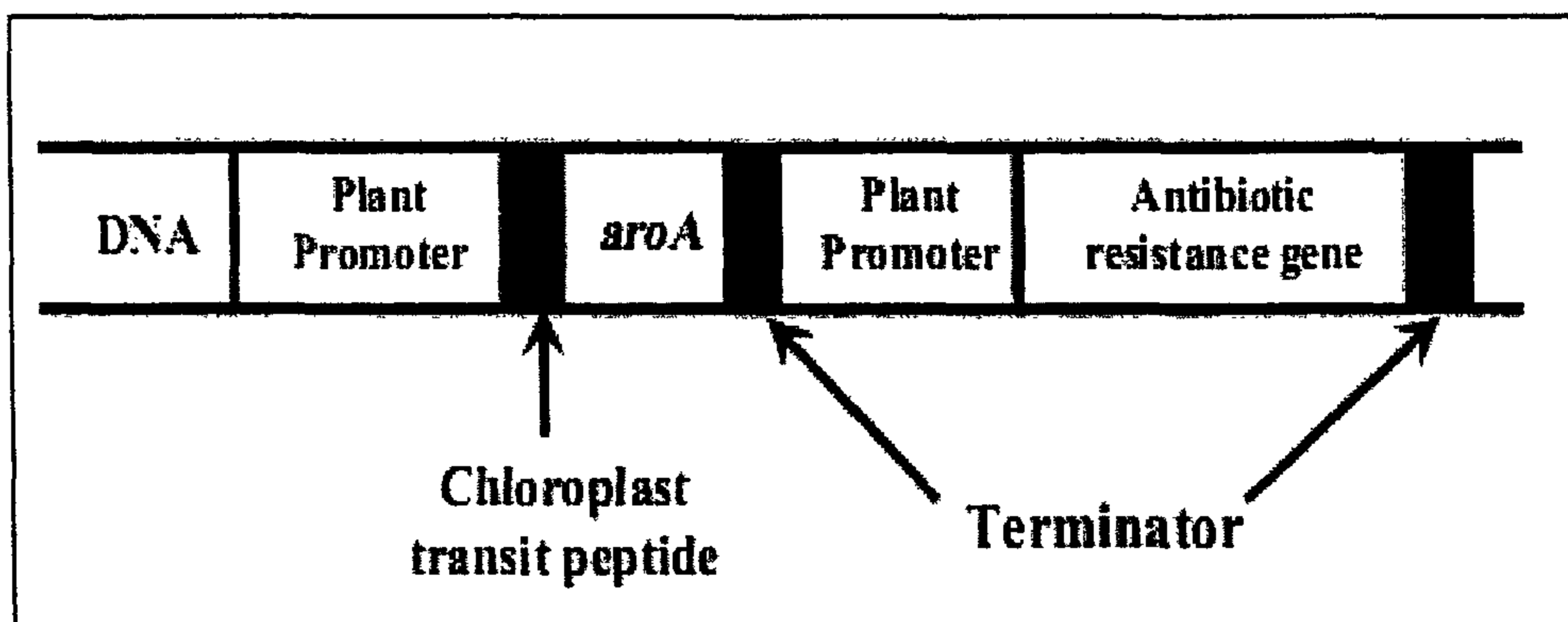
ب- بروموتور نباتى (Plant promoter)

ج- التابع النيوكليوتيدى النباتى لإنهاء النسخ

د- الجين المخبر (Reporter gene (R.G.) وهو جين المقاومة لأحد المضادات الحيوية لتسهيل انتخاب النباتات المعدلة جينياً (T.G.P.).

هـ- قطعة من الـ DNA الصغيرة التى تنسخ وتترجم إلى ببتيدات صغيرة خاصة بالبلاستيدات الخضراء نظراً لأن هذا الإنزيم (EPSPS) يتواجد فى البلاستيدات الخضراء حيث ترتبط هذه الببتيدات الصغيرة (Small chloroplast transit peptide) فى الطرف الذى يحتوى على مجموعة الأمينو من الإنزيم (EPSPS) والتى توجه دخوله إلى البلاستيدات الخضراء ثم تنفصل بعد ذلك عن الإنزيم ويدخل الإنزيم الفعال (EPSPS) فقط إلى البلاستيدات.

٣- استخدام مزارع الأنسجة والبكتيريا أجروباكتيرم *Agrobactrium* التى تحتوى على البلازميد المعاد توليفه بالصورة السابقة لإدخال الجين الطافر (aro A gene) والعناصر الأخرى السابقة إلى الخلية النباتية والحصول فى النهاية على النبات المعدل جينياً بالجين الطافر (aro A gene). ولقد أمكن الحصول على أصناف نباتية جديدة معدلة جينياً تحتوى على الجين الطافر (aro A gene) مثل القطن والكانولا (Canola) بهذه الطريقة بينما استخدمت طريقة أداة القذف (Gene gun) لإدخال الجين الطافر (aro A gene) إلى نبات فول الصويا للحصول على صنف جديد من فول الصويا معدل جينياً يحتوى على الجين الطافر (aro A gene).



شكل (٧٤) : يوضح جزء من البلازميد Ti-plasmid المعاد توليفه والذي حدث به إحلال للجين aro A بالقطعة T-DNA بدلاً من الجينات التى تنتج الهرمونات النباتية

ولقد استخدمت طريقة أخرى لجعل الجين النباتى الطبيعى (aro A gene) وكذلك الجين البكتيرى (aro A gene) مقاوم لتأثير مبيد الحشائش جليفوسات (Glyphosate) من خلال تحويل التابع النيوكليوتيدى للجين (aro A gene) فى نبات الذرة معملياً (In vitro) وأمكن الحصول على الجين المتحور (Altered aro A gene) من نبات الذرة والذي ينتج إنزيم الـ (EPSPS) مقاوم لتأثير مبيد الحشائش الجليفوسات واستخدمت أداة قذف الجين فى إدخال هذا الجين المتحور إلى نبات الذرة وأمكن الحصول على صنف جديد من الذرة معدل جينياً يحتوى على هذا الجين المتحور.

وعلى الرغم من أن مبيدات الحشائش الأخرى مثل مبيد السلفوناميل يوريز (Sulfonylureas) والإيميدازولينونيز (Imidazolinones) لا تستخدم على نطاق تجارى واسع إلا أنه أمكن إنتاج نباتات معدلة جينياً مقاومة لتأثير أى منهما ويرجع تأثير هذين المبيدين فى قتل الحشائش إلى أن أى منهما يثبط إنزيم يلعب دوراً فى الممر التخليقى الحيوى للأحماض الأمينية الليوسين والاييسوليوسين والقالين ويختلف الإنزيم الطافر الذى ينتجه الجين الطافر المقاوم لتأثير أى من المبيدين عن الإنزيم الطبيعى غير المقاوم فى إحلال حامض أمينى واحد ولكنه يظل قادر على تخليق الأحماض الأمينية السابقة. كذلك أمكن إنتاج نباتات معدلة جينياً مقاومة لمبيد الحشائش الجليفوسينات (Glufasinate) الذى يثبط أو يقلل (Blocks) الممر التخليقى الحيوى للحامض الأمينى الجلوماتيك وأمكن الحصول على طفرة تنتج إنزيم مقاوم لتأثير هذا المبيد وتم إدخال هذا الجين الطافر إلى بعض المحاصيل النباتية.

النباتات المعدلة جينياً والمقاومة للحشرات

Transgenic Plants with Insect Resistance

على الرغم من أن الحشائش تعتبر ضارة ولكن الأكثر ضرراً وتكلفة هو مكافحة الآفات الحشرية والديدان الحلقية والأمراض النباتية الفطرية والفيرسية. وانه من الممكن هندسة النباتات جينياً لتصبح مقاومة للآفات الحشرية والأمراض الفطرية والفيرسية. ونظراً لأن طريقة رش النباتات بمبيدات الحشرات الكيميائية هى طريقة مكلفة جداً وخطيرة فى نفس الوقت فضلاً عن أن مبيدات الآفات الحشرية أكثر سمية على الإنسان من مبيدات الحشائش ويرجع السبب فى ذلك إلى أن عديد من الممرات البيوكيميائية الموجودة فى الحشرات توجد فى الإنسان وكذلك القوارض والطيور التى تعيش على المحاصيل الحقلية.

ومن حسن الحظ وجدت مواد سامة أو توكسينات (Toxins) طبيعية ومميتة للحشرات ولكنها غير ضارة بالثدييات. ومن أول الأمثلة على هذه المركبات السامة أو (التوكسينات الطبيعية) تلك التى تنتجها البكتيريا *Bacillus thuringiensis* وهى بكتيريا تعيش فى التربة ويعرف هذا المركب السام باسم (Bt toxin) ولقد استخدم فى رشه على نباتات محصول القطن والذرة للقضاء على يرقات دودة ورق القطن وكذلك ثاقبات الذرة الأوروبية واللذان يسببان

ضرراً كبيراً لكلا المحصولين. فالضرر الذى تسببه ثاقبات الذرة الأوروبية فإنه بالإضافة إلى تكلفة المبيدات الحشرية التى تستخدم فى مقاومتها والذى يصل إلى حوالى بليون دولار سنوياً فإنها تسبب أيضاً جعل نباتات الذرة المصابة بهذه الثاقبات قابلة للعدوى بالمواد السامة الفطرية والتى يكون لها تأثير ضار على الإنسان. وتنتج البكتيريا التابعة لجنس *Bacillus* جراثيم (Spores) تحتوى على بروتينات بلورية تعرف بالكري بروتين (Cry protein) مفيدة حيث أنه عندما تأكل يرقات الحشرات هذه الجراثيم يتكسر البروتين كري (Cry) ويتحرر المركب السام المعروف باسم (Bt-toxin) والذى يرتبط بالأغشية المعوية لليرقات ويولد ثقب تشل النظام الهضمى وبالتالي تموت اليرقات الحشرية (شكل ٧٥).

والأنواع البكتيرية الأخرى التابعة لجنس *Bacillus* تنتج بروتينات بلورية مختلفة عن البروتين كري (Cry) وقسمت فى البداية على أساس الأنواع الحشرية التى تقتلها على النحو التالى:

١ - Cry I يسبب موت حشرات جنس *Lepidoptera*

٢ - Cry II يسبب موت حشرات جنس *lipidopetra* وحشرات جنس *Diptera*

٣ - Cry III يسبب قتل حشرات جنس *Coleoptera*

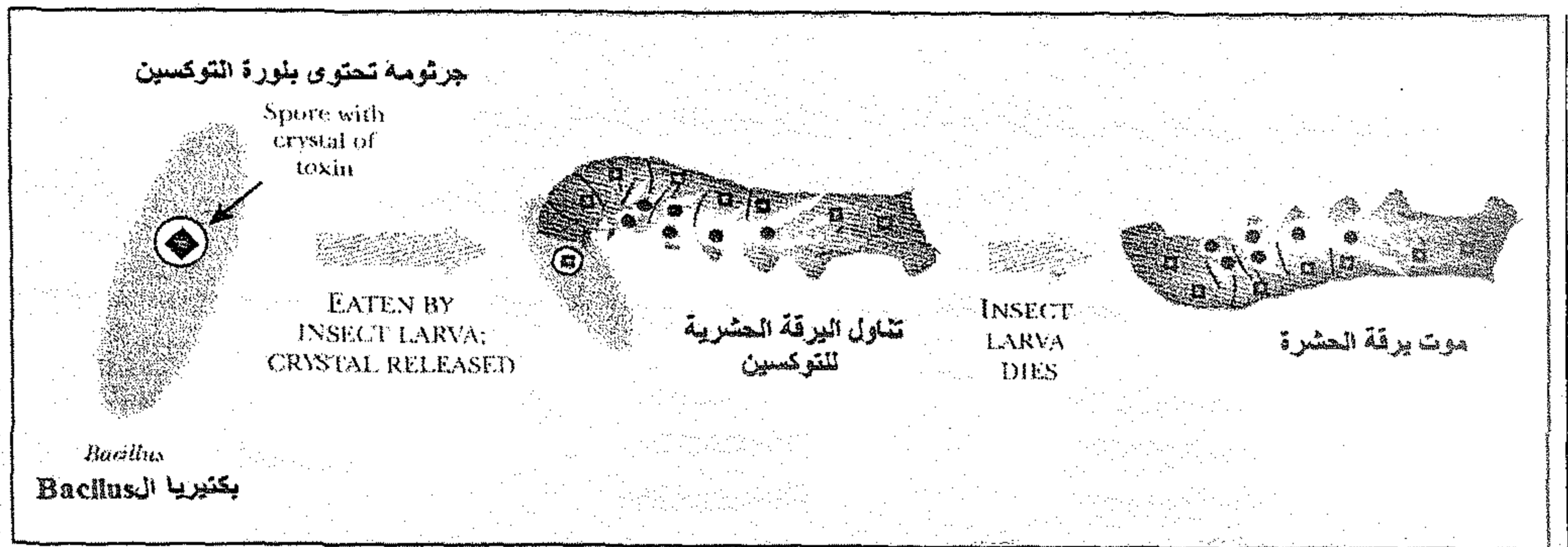
٤ - Cry IV يسبب قتل حشرات جنس *Diptera*.

ومع زيادة طرز البروتين كري (Cry) المختلفة أصبح هذا التقسيم تقسيماً مبسطاً جداً. وبدلاً من رش النباتات بهذا المركب السام (Bt-toxin) لمقاومة الآفات الحشرية استخدم العلماء تكنولوجيا نقل الجين لإدخال الجين (Cry) إلى النباتات مباشرة فعندما أدخل الجين (Cry) إلى نباتات الطماطم كانت هذه النباتات المعدلة جينياً بهذا الجين مقاومة جزئياً ليرقات بعض الأنواع الحشرية. ومع ذلك فإن النباتات المعدلة جينياً بهذا الجين كانت تنتج مستوى منخفض من هذا المركب السام وذلك بسبب أن هذا الجين كان مأخوذاً من البكتيريا وأنه كان مصمماً على أن يظهر تعبيره فى البكتيريا وليس فى النباتات وعلى ذلك تم تحويل أو تعديل هذا الجين (Cry) لتعزيز تعبيره الجينى فى النباتات.

والمركب السام الأصلى (Bt toxin) هو عبارة عن بروتين كبير يحتوى على ١١٥٦ حامض أمينى على الرغم من أن ٦٥٠ حامض أمينى الأولى فى هذا البروتين السام تعتبر أهم الأحماض الأمينية الضرورية فى هذا البروتين والتي تسبب التأثير السام لهذا البروتين ، وعلى ذلك عدل هذا الجين (Bt gene) لينتج الأحماض الأمينية الضرورية فى البروتين السام (٦٥٠ حامض أمينى) ومثل هذا التعديل فى هذا الجين يجعل إنتاج البروتين السام يحتاج إلى طاقة أقل فى إنتاجه.

والخطوة التالية هى وضع هذا الجين المعدل تحت تحكم بروجينوتور ليعطى أعلى مستوى ثابت من التعبير الجينى لهذا الجين المعدل فى النباتات المعدلة جينياً (T.G.P.) وبعض البروجينوتورات المأخوذة من بعض الفيروسات النباتية مثل فيروس (Cauliflower mosaic virus) تحقق هذا الغرض وتجعل هذا الجين المعدل يعطى عشرة أضعاف من البروتين السام فى النباتات المعدلة جينياً. والمحاصيل المعدلة بجين (Bt gene) مثل القطن والذرة لها عديد من المميزات بدلاً من رش الحقول بالمركب السام نفسه من بينها أن هذا المركب السام (Bt toxin) لا ينجرى بالرياح إلى مناطق أخرى وبالتالي لا يحدث تلوث لحقول زراعية أخرى.

واستخدام النباتات أو المحاصيل المعدلة جينياً تختزل كثيراً كمية مبيدات الحشرات المطلوبة، فعلى سبيل المثال فى عام ١٩٩٨ حدث انخفاض فى استخدام مبيدات الحشرات الكيميائية مقداره ٤٥٠٠٠٠ كيلوجرام التى كانت تستخدم فى مقاومة الآفات الحشرية التى تصيب القطن فقط فى الولايات المتحدة الأمريكية وعلى الرغم من ذلك فإن ٤٥% من القطن المنزرع كانت معدلة جينياً (T.G.P.) فقط.



شكل (٧٥): يوضح قتل يرقة الحشرة (Insect larvae) بواسطة المركب السام (Bt toxin) في الخطوات التالية:

١- وجود الجراثيم البكتيرية (Bacterial spores) التي تنتجها البكتيريا Bacillus في الغذاء الذي تتناوله اليرقة .

٢- تحرر البروتين البلوري (Crystalline protein) بتكسير الجراثيم (Spores) والذي يتكسر داخل الأمعاء الوسطى لليرقة منتجاً المركب السام (Toxin) الذي يسبب قتل اليرقة.

النباتات المعدلة جينياً التي تتحمل الظروف البيئية القاسية

Transgenic plant tolerant for environmental stress

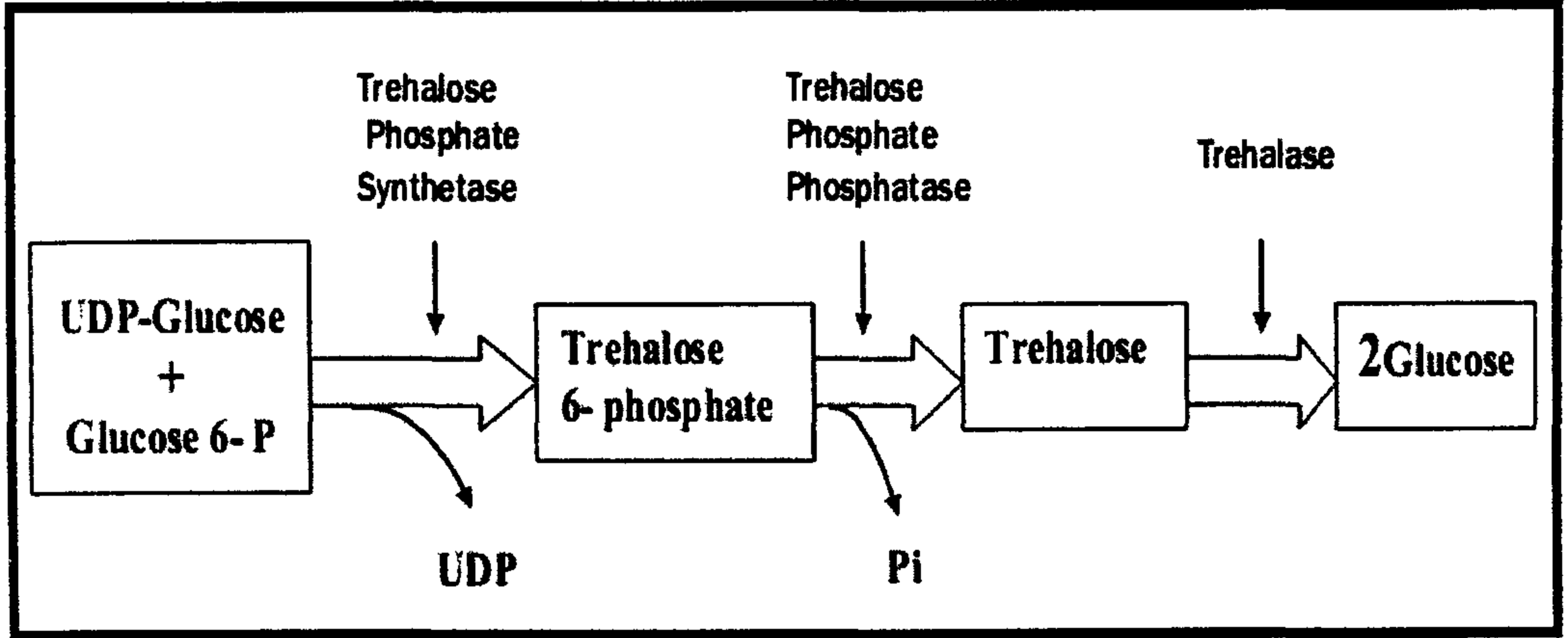
للنباتات قدرة كبيرة على التأقلم تحت الظروف البيئية المختلفة وذلك لأنها تمتلك عديد من الآليات تساعد في العيش والنمو تحت الظروف البيئية القاسية من الإجهاد المائي (Drought) وارتفاع نسبة الأملاح في مياه الري اللذان يعتبران من الظروف القاسية التي تواجهها المحاصيل النباتية في نموها.

ولقد أوضحت الأبحاث أن النباتات التي تتحمل الإجهاد المائي وارتفاع نسبة الأملاح أن سكر تريهالوز (Trehalose) يحمي النبات أثناء الظروف القاسية. وسكر تريهالوز عبارة عن كربوهيدرات مخزنة غير مختزلة وله القدرة على امتصاص وتحرير جزيئات المياه ويتم التخليق الحيوي لهذا السكر بواسطة إنزيمين هما:

١- إنزيم تريهالوز فوسفات سنيثيز Trehalose phosphate synthetase.

٢- إنزيم تريهالوز ٦ فوسفات فوسفاتيز Trehalose 6-phosphate phosphatase.

حيث يبدأ هذا التخليق الحيوي لهذا السكر بمركب UDP-Glucose والمركب Glucose 6-P ينتهي هذا الممر التخليقي الحيوي بسكر التريهالوز. ثم يقوم إنزيم التريهاليز (Trehalase) بتكسير سكر التريهالوز إلى جزيئين من سكر الجلوكوز Glucose (شكل ٧٦).



شكل (٧٦): يوضح تخليق سكر التريهالوز (Trehalose) والإنزيمات التي لها دور في هذا الممر التخليقي الحيوي حيث يوجد تفاعلين إنزيمين تؤدي إلى تكوين سكر التريهالوز هما :

١- يقوم إنزيم Trehalose phosphate synthetase بالتفاعل التالي



٢- يقوم إنزيم Trehalose 6-phosphate phosphatase بتحويل المركب السابق إلى سكر التريهالوز والذي يتحول إلى جزيئين من سكر الجلوكوز glucose بواسطة إنزيم التريهاليز (Trehalase).

Rice Transgenic Plants

نباتات الأرز المعدلة جينياً

لجعل نباتات الأرز أكثر تحملاً للملوحة أو تحمل الإجهاد المائي أمكن تخليق جزيئات من

الـ DNA المعاد توليفها تحتوي على كل من:

١- الجين A الذي ينتج الإنزيم Trehalose phosphate synthetase

٢- الجين B الذي ينتج الإنزيم Trehalose 6-phosphate phosphatase

وتم استخدام البلازميد البكتيري Ti-plasmid للبكتيريا أجروباكتيريوم كحامل (Vector) لكلا الجينين السابقين لنقلهما وادماجهما في جينوم (DNA) نبات الأرز لإنتاج نباتات أرز معدلة جينياً. ولقد وجد أن ادخال وادماج الجينين السابقين في الجينوم النباتي لنباتات الأرز أن النباتات المعدلة جينياً بالجينين السابقين كانت أكثر تحملاً للتركيزات العالية من الأملاح في مياه الري وكذلك كانت أكثر تحملاً للأجهاد المائي ومع ذلك كانت نباتات الأرز المعدلة جينياً بالجينين السابقين والمضاف إليهما بروتين يعمل بصورة مستمرة كانت متقدمة وعلى ذلك فإن نظام التعبير الجيني للجينات المنقولة سوف يؤثر على المحصلة النهائية للمحصول. ونباتات الأرز المعدلة جينياً بالصورة السابقة لم تستخدم حتى الآن حقلياً ولكنها مازالت في مراحلها التجريبية ، وبالرغم من ذلك فإنها تبشر بإمكانية اكتشاف طرق جديدة أخرى لزيادة إنتاج الغذاء تحت الظروف البيئية القاسية.

إنتاج نباتات معدلة جينياً مقاومة للإصابة الفيروسية

Production of transgenic plants resistant to virus infection

من بين الطرق العديدة التي كانت تستخدم لوقاية النباتات من الإصابة بالأمراض الفيروسية تلك الطريقة التي اعتمدت على الظاهرة التي اكتشفها العالم H.H. McKinney وهي إمكانية تحصين النباتات من الإصابة بالأمراض الفيروسية عن طريق تحصين النباتات بعدوها بسلالة ضعيفة من الفيروس لتصبح مقاومة للإصابة بالسلالة القوية من نفس الفيروس. وقد استعملت هذه الطريقة في تحصين وحماية نباتات الطماطم على المستوى التجاري في بريطانيا لوقاية نباتات الطماطم النامية في الصوب الزجاجية من الإصابة بفيروس التبرقش (Tomato mosaic virus). ولقد أوضحت الأبحاث أن هذه المقاومة ترجع إلى دور بروتين الغلاف الفيروسي للفيروس المستخدم في التحصين والذي يعيق الإصابة بنفس الفيروس النشط.

ولقد نجح العالم Powell Abel ومعاونيه في إدخال الجين الذي ينتج الغلاف البروتيني لفيروس تبرقش أوراق الدخان (Tobacco mosaic virus) في خلايا نباتات الدخان النامية في مزارع لزراعة الأنسجة عن طريق استخدام البكتيريا *A. tumefaciens* التي تحمل البلازميد Ti-plasmid المعاد توليفه والذي يحمل هذا الجين وحصل على نباتات دخان معدلة جينياً تستطيع تخليق بروتين الغلاف

الفيرسى بفيرس تبرقش الدخان وكانت هذه النباتات المعدلة جينياً مقاومة وراثياً للفيرس. وتتلخص الطريقة التي اتبعتها هذا العالم في الخطوات التالية:

١- تخليق وعزل الجين الذي ينتج الغلاف البروتيني الفيرسى عن طريق استخدام النسخ العكسي لخيط الـ RNA الفيرسى بواسطة إنزيم النسخ العكسي (Reverse transcriptase) لنسخ جين تخليق بروتين الغلاف الفيرسى وتكوين خيط الـ c-DNA ثم استخدام إنزيم DNA polymerase لبلورة الـ DNA لتكوين خيط مزدوج من الـ DNA يمثل جين إنتاج الغلاف البروتيني الفيرسى وبذلك استطاع الحصول على هذا الجين.

٢- إضافة التتابعات النيوكليوتيدية لبداية النسخ على شمال هذا الجين وإضافة كذلك التتابعات النيوكليوتيدية التي تمثل انتهاء نسخ الجين على يمين هذا الجين وتكوين الجين المعاد توليفه بالصورة المرغوبة.

٣- إدخال هذا الجين المعاد توليفه بالبلازميد Ti-plasmid في المنطقة T-DNA من هذا البلازميد بإحلاله محل الجينات التي تنتج الهرمونات المحدثة للورم.

٤- إدخال هذا البلازميد Ti-plasmid المعاد توليفه بالجين المرغوب إلى خلايا البكتيريا *A. tumefaciens* خالية من البلازميد Ti-plasmid وبذلك حصلوا على بكتيريا مكونة clone بالجين المرغوب.

٥- إضافة هذه البكتيريا المكونة بالجين المرغوب إلى مزارع خلوية لخلايا نبات الدخان قابلة للإصابة بمرض التبرقش وبذلك سوف تنتقل قطعة الـ T-DNA من البلازميد المعاد توليفه إلى الخلايا النباتية وتندمج بأحد الكروموسومات وبذلك حصلوا على نباتات دخان كاملة النمو معدلة جينياً تحمل جين إنتاج بروتين الغلاف الفيرسى والتي كانت مقاومة لفيرس التبرقش عند إصابتها بالفيرس.

٦- هذه النباتات المعدلة جينياً بجين إنتاج بروتين الغلاف الفيرسى كانت جميع خلاياها تحتوي هذا الجين ليس ذلك فقط ولكن النسل الناتج من تكاثر هذه النباتات المعدلة جينياً كانت تحمل أيضاً هذا الجين والذي أصبح صفة وراثية ثابتة في التركيب الجيني للنباتات المعدلة جينياً والمقاومة لفيرس

تبرقش أوراق الدخان. ولقد نجحت هذه الطريقة في إنتاج نباتات معدلة جينياً مقاومة لبعض الفيروسات منها:

أ - إنتاج نباتات طماطم معدلة جينياً بجين إنتاج بروتين الغلاف الفيروسي والمقاومة وراثياً لفيروس تبرقش أوراق الطماطم وتباع بذور هذه النباتات المعدلة جينياً بهذا الجين في الأسواق على نطاق تجاري.

ب- إنتاج صنف من البطاطس والمعدل جينياً بجين إنتاج بروتين الغلاف الفيروسي والمقاوم لفيروس الـ Zucchini Yellow Mosaic Virus ويباع هذا الصنف حالياً في الأسواق على نطاق تجاري.

ج- إنتاج صنف من الباباؤ المعدل جينياً بجين إنتاج بروتين الغلاف الفيروسي والمقاوم لفيروس التبغ الحلقي في الباباؤ (Papay ringspot virus) والذي يباع الآن تحت الاسم التجاري Rainbow.

إنتاج العقاقير الطبية بواسطة النباتات المعدلة جينياً

Production of protein drugs by transgenic plants

من بين تطبيقات التقنية الحيوية إنتاج عديد من العقاقير البروتينية الطبية الجديدة والتي وافقت عليها منظمة الصحة العالمية كما وافقت عليها أيضاً الوكالة المنظمة لاستخدام العقاقير الطبية في المملكة المتحدة وأوروبا. وهذه المنتجات الناتجة بواسطة التقنية الحيوية كانت باستخدام البكتيريا المعدلة جينياً أو الفطر المعدل جينياً أو باستخدام خلايا الثدييات المعدلة جينياً والنامية في مزارع خلوية.

واستخدام النباتات المعدلة جينياً لإنتاج بعض العقاقير البروتينية الطبية هو عمل رائد قامت به عدد من شركات التقنية الحيوية حيث أوضحوا أن النباتات المعدلة جينياً لهذا الغرض تكلفتها أقل نسبياً بالمقارنة لاستخدام المزارع الخلوية فضلاً عن أن النباتات المعدلة جينياً تستطيع تنفيذ التحورات المناسبة التي تحدث للبروتينات لكي تصبح فعالة وظيفياً والتي تتضمن إضافة الكربوهيدرات

والفوسفات أو مجاميع كيميائية أخرى للبروتينات والفشل في حدوث مثل هذه التحورات مع التفاعل مع البروتينات المستقبلية بالخلية أو أنها تسبب هدم لمثل هذه التحورات لبروتينات الكائنات حقيقية النواه يمنع هذه البروتينات ويصبح الدم خالياً منها بسرعة كبيرة.

وما زالت الأبحاث التي تجرى على النباتات لإنتاج نباتات معدلة جينياً تنتج البروتينات المرغوبة في مراحلها الأولى حيث أن معظم البروتينات التي تنتجها النباتات المعدلة جينياً تستخدم بغرض الأبحاث وليست لاستخدام الإنسان. ومع ذلك فقد حصلت إحدى شركات التقنية الحيوية على موافقة منظمة الصحة العالمية على تسويق مصل الدجاج والمنتج بواسطة المزارع الخلوية للخلايا النباتية المعدلة جينياً. ويواصل العلماء جهودهم في شركات التقنية الحيوية لإنتاج بعض الأمصال من خلال الجزء الذي يؤكل من النبات مثل الثمار والدرنات. وتعتبر هذه الوسيلة أقل تكلفة في توصيل المصل للدول النامية بدون تحديد موعد مسبق ومحدد لتخزين المصل في الثلاجات كما أنها وسيلة تحتاج إلى قليل من المهارات لاستخدام المصل.

ولقد تم بنجاح هندسة النبات بجين منقول ما ينتج جزء خاص من بروتين بكتيري يسبب إنتاج أجسام مضادة في الحيوانات. وكذلك استطاع العلماء والباحثين في جامعة أريزونا (Arizona) من إنتاج واختبار مصل يعطي عن طريق الفم للإنسان ضد فيروس التهاب الكبد الوبائي طراز B (Hepatitis B) والناجم من نباتات بطاطس معدلة جينياً. والجين الذي تم إدخاله في نباتات البطاطس المعدلة جينياً كان يحتوي على نفس التسلسل النيوكليوتيدي لفيروس التهاب الكبد الوبائي طراز B والذي يستخدم كمصل عن طريق الحقن. وباختبار هذا المصل وجد أن المتطوعين الذين تناولوا درنات البطاطس غير المطهية المعدلة جينياً بهذا الجين استطاعوا تكوين أجسام مضادة لفيروس التهاب الكبد الوبائي طراز B بينما المتطوعين الذين تناولوا درنات البطاطس غير المطهية التي ينقصها هذا الجين لم يستطيعوا تكوين أجسام مضادة لفيروس التهاب الكبد الوبائي طراز B. ومع ذلك لم يتم متابعة إنتاج هذا المصل بمثل هذه الطريقة لأنه يتطلب تناول البطاطس الخام غير المطهية. ولقد أوضحت هذه الدراسة ودراسات أخرى أن مثل هذه الأمصال الناتجة من النباتات المعدلة جينياً تسبب تنبيه الاستجابة المناعية في جسم الإنسان ولذلك فإن مثل هذه الأمصال التي تنتجها النباتات

المعدلة جينياً ويتم استخدامها عن طريق الجزء الذي يؤكل من النبات سواء كانت ثمار أو درنات مازالت تحت الدراسة.

ومنذ عام ١٩٩٢ وحتى عام ٢٠٠٢ أمكن إنتاج أكثر من ٢٠ مصل مختلف من النباتات المعدلة جينياً كانت موجهة ضد بعض الفيروسات التي تسبب أمراض للإنسان والتي تم إنتاجها بواسطة بعض ثمار الفاكهة وبعض الخضروات المعدلة جينياً.

ولقد قامت عدد من شركات التقنية الحيوية في كل من المملكة المتحدة وأوروبا بوضع برامج متطورة لإنتاج العقاقير الطبية الحيوية بواسطة النباتات المعدلة جينياً. وفي بعض الحالات تم اختبار مثل هذه العقاقير والأمصال على الإنسان بما فيها مصل السرطان الناتج من نباتات البطاطس المعدلة جينياً وكذلك الإنزيم الذي تم تصميمه لمعالجة الأفراد المصابين بتليف الرئة والمنتج بواسطة نباتات الذرة المعدلة جينياً. كما أمكن إنتاج الأنترفيرون المضاد لنمو وتكاثر الفيروسات في الخلايا المعدية بالفيرس بواسطة نبات Duckweed المعدل جينياً بالجين المرغوب وهو نبات بسيط ينمو في المياه. والحواجر التي تقف أمام إنتاج العقاقير الطبية الحيوية من النباتات المعدلة جينياً لا تتضمن فقط كمية الناتج وفعاليته العملية ولكنها تتضمن أيضاً تكاليف إنتاج مثل هذه العقاقير الطبية الحيوية بواسطة النباتات المعدلة جينياً بالجينات المرغوبة كما تتطلب إنتاج العقاقير الطبية الحيوية بواسطة النباتات المعدلة جينياً استخدام مزارع معزولة وأمنة لمنع حدوث تلوث المحاصيل الأخرى من انتقال الجينات المنقولة والمرغوبة من النباتات المعدلة جينياً إلى نباتات المحاصيل الأخرى.

المعالجة النباتية للملوثات والاستخدامات الأخرى للنباتات المعدلة وراثياً

Phytoremediation and Other uses for Transgenic Plants

على الرغم من أن أهم تطبيقات البيوتكنولوجيا هو إنتاج أصناف نباتية معدلة جينياً جديدة مقاومة وراثياً لمبيدات الحشائش أو مقاومة وراثياً للآفات الحشرية وكذلك تحمل الظروف البيئية القاسية مثل الإجهاد المائي وارتفاع نسبة الأملاح في مياه الري وكذلك إنتاج أصناف نباتية معدلة جينياً جديدة ذات الاحتياج القليل من الأسمدة الكيميائية وذات القيمة الغذائية العالية فقد أمتد استخدام النباتات المعدلة جينياً خارج مجال التطبيق الزراعي والتي من بينها تنظيف البيئة (Phytoremediation).

وهذا التطبيق يتمثل فى استخدام النباتات المعدلة جينياً لتنظيف البيئة سواء تنظيف المياه أو التربة من الملوثات ولكن هذا التطبيق مازال فى مراحله الأولى ولكنه يخطو خطوات سريعة فى السنين القليلة الماضية . وعموماً يوجد طريقتين لحماية تلوث التربة باستخدام النباتات:

الغطاء النباتى الارضى Photostabilization

وهذه الطريقة ببساطة هى عمل غطاء أرضى من النباتات لحماية الموقع من التلوث حيث يقدم هذا الغطاء الأرضى النباتى حماية جيدة من الرياح وفيضان المياه. وعلى الرغم من أن هذه الحماية بالغطاء النباتى تكون بواسطة النباتات الطبيعية إلا أن استخدام النباتات المعدلة جينياً سوف يودى إلى زيادة النظام الجذرى أو تشجيع النباتات لتحمل التلوث.

استخلاص الملوثات من التربة Photoextraction

وفى هذه الطريقة تقوم النباتات بتجميع الملوثات فى أنسجتها ثم تحصد النباتات بعد ذلك وتعامل بطريقة كما ينبغي. وتحتوى بعض النباتات على نظم طبيعية لتجميع أيونات العناصر الثقيلة بينما البعض الآخر من النباتات تحتاج إلى تحويل لتمتص المواد السامة ومن بين هذه النباتات التى تقوم بتجميع المواد السامة فى أنسجتها بصورة طبيعية نبات (Pteris vittata) Brakefern حيث يستطيع تجميع حوالى ٧٥٠٠ ميكروجرام/جرام من الارسينيك (Arsenic) من الموقع الملوث وبعض النباتات تستطيع تجميع أو تركيز الارسينيك فى أوراقها بمقدار ٢٠٠ مرة قدر التركيز الموجود فى التربة.

ومن الأمثلة الأخرى أنه أمكن تخليق نباتات معدلة جينياً لإزالة الملوثات السامة حيث أمكن إضافة كل من الجين (mer A) والجين (mer B) المأخوذين من البكتيريا إلى جينوم نباتات الأرابيدوبسيس (Arabidopsis) ونبات الدخان وأشجار Polar trees ولقد وجد أن البروتينات التى ينتجها هذين الجينين تزيل الزئبق من مركبات الزئبق العضوية وتحولها إلى عنصر زئبق والذى يتطاير ويهرب فى الهواء.

ودراسة جينومات (Genomes) النباتات التى تقوم بتجميع الزئبق بصورة طبيعية سوف يكون مفيداً جداً فى وصف البروتينات الطبيعية وكذلك الممرات الحيوية التى تسبب التخلص من البروتينات السامة. وهذا الطراز من المعرفة سوف يساعد كثيراً فى تخطيط الأبحاث لإنتاج نباتات معدلة جينياً من أجل تنظيف البيئة (Phytoremediation).

Bt Toxic and Butterflies**المركب السام Bt والفراشات**

نقطة الجدل الأخرى التى تثار حول النباتات المعدلة جينياً هو تأثيرها على الكائنات الأخرى غير الكائنات الهدف بمعنى تعرض النباتات أو الحيوانات بطريقة غير مقصودة إلى المحاصيل المعدلة جينياً. ففي البحث الذى نشر فى مجلة Nature أوضح ان فراشات حشرة Monarch butterflies ماتت بأكلها حبوب لقاح من نباتات الذرة المعدلة جينياً والتى تحمل الجين Bt. هذه الدراسة أزعجت المؤسسة العلمية وكذلك جماعات حماية البيئة ففي هذه الدراسة قضت يرقات حشرة Monarch الصيف فى أجزاء من كندا وفى الغرب الأوسط تتغذى بصفة خاصة على نباتات حشيشة اللبن (Milkweed plants) وفى النهاية هاجرت الفراشات تامة النمو إلى مناطق خاصة من المكسيك ، وفى الربيع هاجرت أو عادت الفراشات إلى الغرب الأوسط من كندا لوضع البيض ثم تكررت الدروة. وفى التجربة التالية قام العلماء بجامعة كورنيل (Cornell University) بطحن أوراق نبات حشيشة اللبن مع حبوب لقاح نبات الذرة المعدل جينياً تحمل الجين Bt وذلك لمقارنتها مع أوراق نبات حشيشة اللبن المطحونة مع حبوب لقاح طبيعية لنبات الذرة وكذلك مع أوراق نباتات حشيشة اللبن بدون حبوب لقاح. ولقد وجد أن اليرقات التى أكلت حبوب لقاح نبات الذرة المعدل جينياً والذى يحتوى على الجين Bt كان نموها بطيئاً وكانت تأكل أقل وماتت بمعدل مرتفع عن باقى المجموعتين الأخرتين.

ولكن هناك كثيراً من الاعتراضات حول هذه الدراسة منها على سبيل المثال أنها لم توضح كمية حبوب اللقاح الموجودة بالفعل على نباتات حشيشة اللبن وأن الباحثين وضعوا كمية من حبوب اللقاح اكبر من تلك المشاهدة فى حقول الذرة. وبالإضافة إلى ذلك أن اليرقات غالباً ما ترفض أكل حبوب اللقاح التى تحتوى على الجين Bt التى تغطى أوراق نبات حشيشة اللبن مما يعضد ذهاب وتحرك هذه اليرقات إلى نباتات حشيشة اللبن الأخرى والموجودة فى البيئة الطبيعية.

ولقد وجد جماعات حماية البيئة أن هذه الدراسة هى علامة توضح ان المحاصيل المعدلة جينياً سوف تسبب ضرراً بالبيئة مثل المبيدات الكيميائية ومع ذلك فإن أفضل نتيجة لهذا الاعتراض هى توجيه البحث والدراسة على النباتات المعدلة جينياً والتى تحمل الجين Bt وتأثيرها على الفراشات والكائنات الأخرى غير الهدف .

ولقد تم تقدير كمية حبوب اللقاح فى حقول الذرة وكذلك الموجودة على أوراق نباتات حشيشة اللبن والمحيطه بحقول الذرة. ووجد أن يرقات حشرة (Monarch) تتأثر بوجود حبوب بمقدار ١٠٠ حبة لقاح لكل سم^٢ والتي تحتوى على الجين Bt وهذا المستوى من حبوب اللقاح يتواجد فقط فى نباتات حشيشة اللبن المباشرة والمحيطه بحقول الذرة أو تلك الموجودة داخل حقول الذرة وأن هذا المستوى لا يوجد أبداً فى المناطق المجاورة المفتوحة حيث وجد أنه على بعد مسافة ٢ متر من حافة حقول الذرة يصل تركيز حبوب اللقاح إلى ١٤ حبة لقاح لكل سم^٢. وفى البيئة الطبيعية لا تتغذى يرقات حشرة الـ Monarch على هذه الأوراق المغطاة بحبوب اللقاح ولكنها تتحرك إلى جزء آخر من النبات وبالإضافة إلى ذلك فإن سقوط الأمطار أو وجود الرياح أثناء تكوين حبوب اللقاح سوف يؤثر كثيراً على هذا العدد من حبوب اللقاح. فسقوط المطر لمرة واحدة سوف يزيل نصف كمية حبوب اللقاح الموجودة على النبات. والأكثر من ذلك فإن فراشات حشرة الـ Monarch تضع بيضها على أوراق نبات حشيشة اللبن التى لا تحتوى على حبوب اللقاح وهذا يقلل أيضاً من المخاطر الضارة.

ولقد أجريت دراسات أخرى لتحديد أى طراز من المركب السام (Bt toxin) التى تؤثر على يرقات حشرة الـ Monarch أوضحت الدراسات أن هناك طراز واحد من هذه المركبات السامة يكون له تأثير ضار حقيقى بينما الطرز الأخرى كانت غير ضارة ومع ذلك فإن هذه الدراسة أجريت فى المعمل ولم تكن هناك فرصة لليرقات فى الاختيار للتغذى على أوراق نباتات حشيشة اللبن لا تحتوى على حبوب لقاح.

الباب التاسع

الحيوانات المعدلة جينياً

Transgenic Animals (T.G.A.)

قام الإنسان منذ آلاف السنين بتحسين المحاصيل النباتية والحيوانات المستأنسة عن طريق التربية بالانتخاب. ومن الواضح أنه كلما زادت معلوماتنا الوراثية كلما كانت محاولات تحسين المحاصيل النباتية والماشية أسرع وأكثر تأثيراً. وفي الوقت الحاضر يمكن تحويل التركيب الجيني (Genotype) للنباتات والحيوانات عن طريق هندسة الجينات أو الهندسة الوراثية. ومعظم التجارب الأولية كانت تجرى على الفئران (Mice) لإنتاج حيوانات معدلة جينياً (T.G.A.) وأن معظم الحيوانات الكبيرة والمستأنسة لم يتم هندستها جينياً بما فيها الماشية والأغنام وكذلك الحيوانات الصغيرة مثل الكلاب والقطط.

وفي الحيوانات المعدلة جينياً تحمل كل خلية من خلايا الحيوان الجينات الجديدة في النسيج التناسلي (Germline) وليس في الخلايا الجسمية (Somatic cells) كما في حالة العلاج الجيني (Gene therapy) وبذلك سوف تورث هذه الجينات الجديدة إلى النسل في الحيوانات المعدلة جينياً. وعموماً فإن مصدر هذه الجينات الجديدة التي يتم نقلها يكون مصدرها من كائنات أخرى وتعرف بالجينات المنقولة (T.G.) والتي قد تكون من كائنات نفس النوع أو من أنواع حيوانية أخرى ليس بينها صلة قرابة تماماً أو يكون مصدرها من النباتات أو الفطريات أو البكتيريا. ويجب هندسة الجينات المنقولة قبل إدخالها في خلايا الحيوان العائل بحيث تحتوى على بروتوتور قوى يسمح للجين المنقول بالتعبير الجيني له تحت ظروف معينة.

Creation Transgenic Animalsتخليق الحيوانات المعدلة جينياً

بمجرد أن يصبح الجين المنقول متاحاً تستخدم طريقة الحقن النووى الدقيق (Nuclear microinjection) لتخليق الحيوان المعدل جينياً (T.G.A.) باتباع الخطوات التالية (شكل ٧٧):

١- حقن الجين المنقول (T.G.) فى خلية البويضة بعد الاخصاب مباشرة حيث تحتوى خلية البويضة (Egg cell) على كل من نواة البويضة الأحادية ونواة الحيوان المنوى الأحادية غير مندمجتين معاً وتعرف كل منهما فى هذا الوقت باسم النواة الأولية (Pro-nucleus) ويجب حقن الجين المنقول مباشرة فى نواة الحيوان المنوى الموجود بخلية البويضة وقبل اندماج النواتين معاً (شكل ٧٧). ويحتاج هذا الحقن الدقيق إلى أدوات خاصة ومهارة عالية. ويتراوح معدل نجاح هذه الطريقة ما بين ٥% إلى ٤٠% من المحاولات التى تجرى باختلاف المعامل البحثية.

٢- تحفظ خلية البويضة المعدلة جينياً على بيئة غذائية تسمح بحدوث الانقسامات الخلوية لتكوين الجنين والذى ينقل بعد ذلك إلى رحم الأم الحاضنة (Foster mother) وبداخل رحمها ينمو الجنين المعدل جينياً ويستمر فى النمو داخل رحم الأم الحاضنة حتى يولد الحيوان الجديد والمعدل جينياً (T.G.A.).

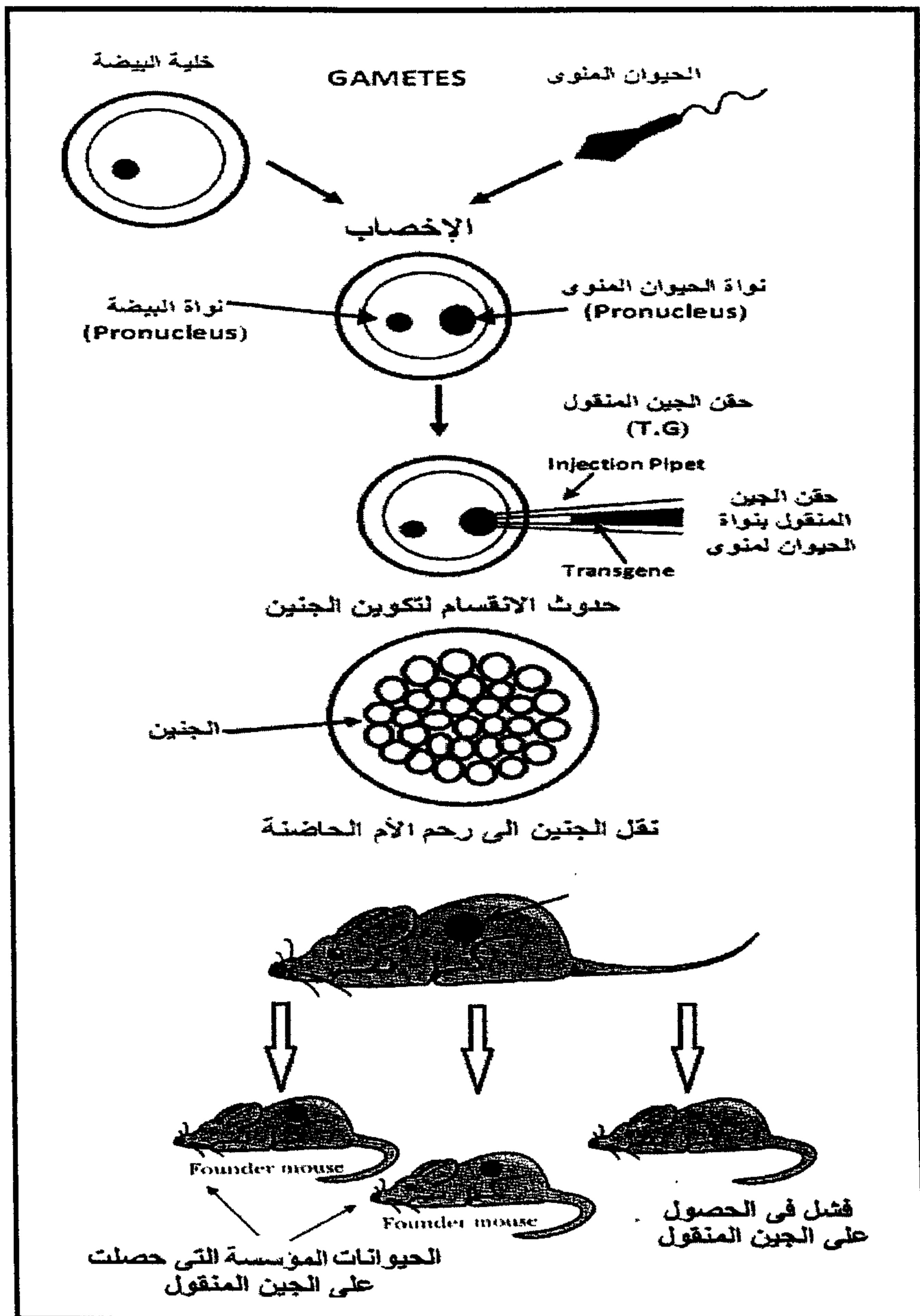
٣- بعض هذه الحيوانات المولودة الصغيرة والمعدلة جينياً سوف تحتوى على الجين المنقول بصورة ثابتة لإندماجه بأحد الكروموسومات وبعض الحيوانات الأخرى تفشل فى الحصول على الجين المنقول بسبب فقدده. وتسمى الحيوانات التى حصلت على الجين المنقول بصورة ثابتة باسم الحيوانات المؤسسة (Founder animals, F.A.).

٤- يجرى التزاوج بين ذكر وانثى من هذه الحيوانات المؤسسة (F.A.) لتكوين سلالة حيوانية جديدة تحمل نسختين من الجين المنقول (T.G.). ويجب ملاحظة أن الحيوانات المنشأة يحتوى كل حيوان منها على نسخة واحدة من الجين المنقول مندمجاً بأحد الكروموسومات وبالتالي فإنها تعتبر خليطة (Heterozygous) بالنسبة للجين المنقول وعلى ذلك سوف يكون ٢٥% من النسل الناتج من هذا

التزاوج يحتوى على نسختين من الجين المنقول وبذلك تعتبر حيوانات نقية (Homozygous) بالنسبة للجين المنقول بينما يحتوى ٥٠% من النسل على نسخة واحدة من الجين المنقول وبذلك تعتبر حيوانات خليطة (Heterozygous) بالنسبة للجين المنقول وكذلك لا يحتوى ٢٥% من النسل على الجين المنقول.

وتعتبر الحيوانات المعدلة جينياً والنقية للجين المنقول أكثر فائدة لأنه إذا أجرى التزاوج بينها تنتج نسلًا جميع أفرادها تحتوى على نسختين فقط من الجين المنقول (T.G.). ومع ذلك توجد بعض الاختلافات الناشئة عن الوقت الذى يحدث فيه اندماج الجين المنقول فى نواة الحيوان المنوى الموجودة فى خلية البويضة وهذه الاختلافات على النحو التالى:

١. فى بعض الحالات يحدث اندماج للجين المنقول (T.G.) فى نواة الحيوان المنوى قبل اندماج النواتين المذكورة والمؤنثة معاً مما يترتب عليه أن تحتوى جميع خلايا الجنين على الجين المنقول.
 ٢. فى بعض الحالات الأخرى يحدث اندماج للجين المنقول (T.G.) بعد اندماج النواتين معاً وحدوث عديد من الانقسامات الخلوية للجنين وبذلك سوف تحتوى بعض خلايا الجنين على الجين المنقول بينما لا يحتوى عليه البعض الآخر من الخلايا.
 ٣. فى بعض الحالات الأخرى قد يحدث اندماج لعديد من نسخ الجين المنقول فى نفس النواة بصورة متكررة ومثل هذه الحالات لا تكون ثابتة وغالباً ما يحدث إزالة لهذه النسخ الإضافية من الجين المنقول فى الأجيال التالية.
- وعموماً يحدث إدخال الجين المنقول (T.G.) فى كروموسومات خلية البويضة (Egg cell) العائلة بطريقة عشوائية وغالباً ما يحدث ذلك عند المناطق من الكروموسومات التى يحدث عندها كسور فى الكروموسومات بطريقة تلقائية.

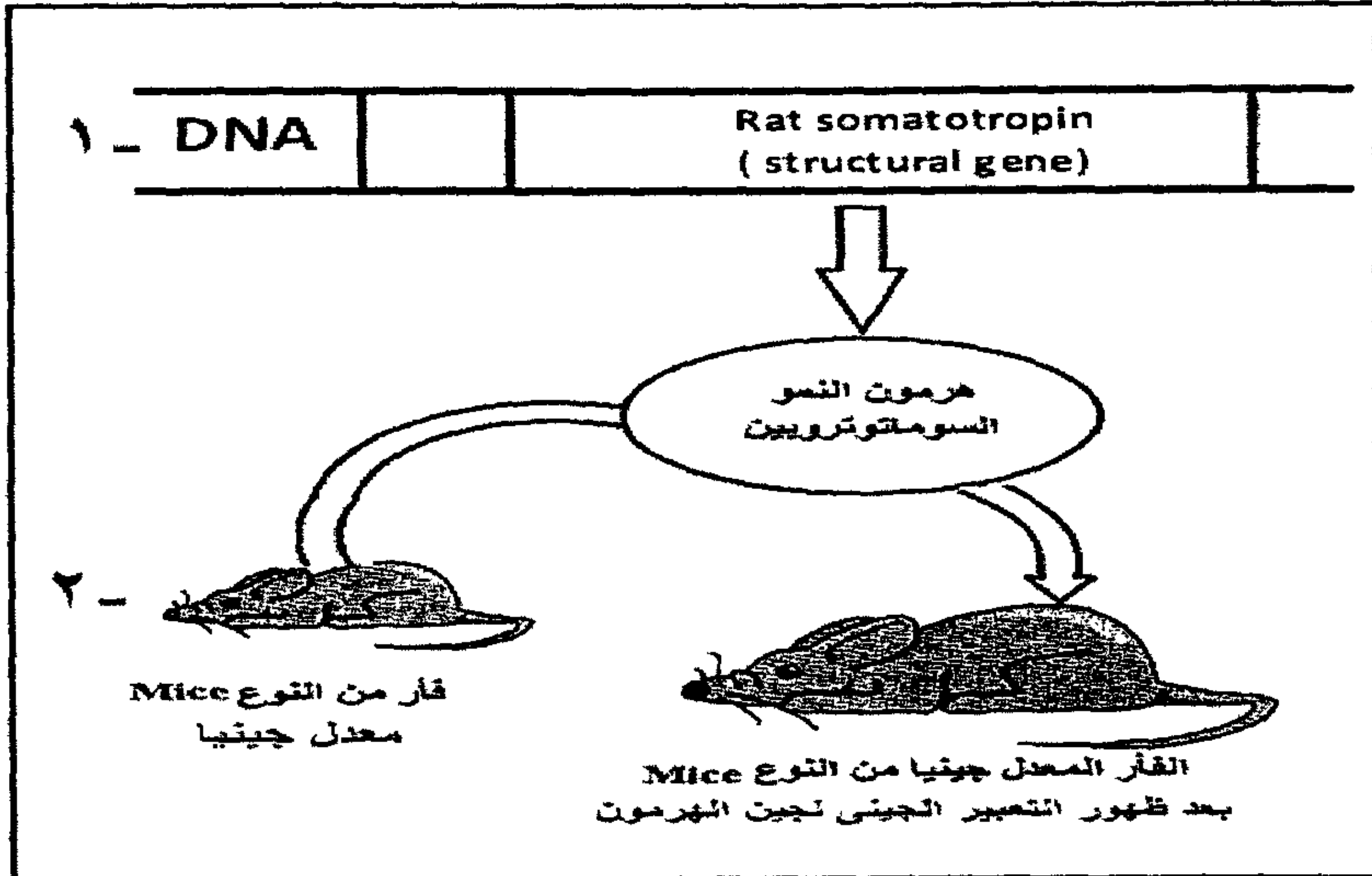


شكل (٧٧): يوضح خطوات تخليق حيوان معدل جينياً بواسطة الحقن النووي الدقيق (Nuclear Microinjection)

Transgenic Miceالفئران المعدلة جينياً

يوجد نوعين مختلفين من الفئران أحدهما النوع (Mice) وهو نوع صغير الحجم بينما النوع الآخر هو النوع (Rat) وهو نوع كبير الحجم. ولقد استخدمت تكنولوجيا نقل الجين في تخليق فئران كبيرة الحجم من النوع Mice عن طريق نقل الجين الذى ينتج هرمون النمو السوماتوتروبين (Somatotropin) من نوع الفئران (Rat) وإدماجه فى جينوم الفئران الصغيرة الحجم من النوع (Mice) باستخدام طريقة الحقن النووى الدقيق لخلايا البويضات المخصبة وهذا الهرمون يتركب من سلسلة مفردة عديدة الببتيد ينتجها جين مفرد. وفى عام ١٩٨٥ تم كلونة هذا الجين (Gene cloning) وإنتاج فئران كبيرة الحجم من النوع Mice على النحو التالى (شكل ٧٨):

- ١- عزل الجين الذى ينتج هرمون السوماتوتروبين من الفئران من النوع Rat .
- ٢- حقن هذا الجين المنقول (T.G.) فى بويضات مخصبة للفئران من النوع Mice.
- ٣- نقل هذه البويضات المخصبة إلى أمهات حاضنة من النوع (Mice) لإنتاج أجنة ونسل معدل جينياً من الفئران من النوع (Mice). ولقد وجد أن النسل الناتج والمعدل جينياً كان أكبر حجماً بمقدار مرتين عن الفئران من النوع (Mice) الموجودة بالطبيعة على الرغم من أنها لم تصل إلى حجم الفئران الكبيرة من النوع (Rat). ولقد كانت هذه الفئران المعدلة جينياً تمثل أول حالة لإستخدام تكنولوجيا نقل الجين من حيوان لآخر. ولقد أجريت محاولات أخرى ناجحة لإدماج هرمون النمو الإنسانى وهو هرمون السوماتوتروبين فى الفئران من النوع Mice وكانت الفئران الناتجة والمعدل جينياً أكبر حجماً من الفئران الطبيعية.



شكل (٧٨): يوضح إنتاج فأر كبير الحجم معدل جينياً من النوع Mice

- ١ - قطعة الـ DNA التي تحتوي على الجين الذي ينتج هرمون السوماتوتروبين المأخوذ من الفأر كبير الحجم من النوع Rat
- ٢ - إنتاج فأر صغير الحجم من النوع Mice وظهور التعبير الجيني للجين الذي ينتج هرمون السوماتوتروبين والذي أدى إلى إنتاج فأر كبير الحجم من النوع Mice.

إنتاج بعض البروتينات بواسطة الأبقار المعدلة جينياً

Production of some protein using transgenic cows

استخدمت تكنولوجيا الجين المنقول في كلونة (Cloning) البكتيريا بجين إنتاج هرمون السوماتوتروبين المعزول من الأبقار بطريقة تسمح بظهور التعبير الجيني له في البكتيريا مما يسمح بإنتاج كميات كبيرة من هذا الهرمون ويعرف هذا الهرمون الآن باسم (rBST) Recombinant Biovine Somatotropin والذي يستخدم في صناعة الالبان لزيادة إنتاج اللبن فعند حقن الأبقار بكميات إضافية من هذا الهرمون أدى ذلك إلى زيادة إنتاج اللبن بدلاً من الحصول على أبقار عملاقة (Giant cows) كما هو الحال في حالة الفئران المعدلة جينياً. ويباع حالياً اللبن المنتج من الأبقار المعاملة بهذا الهرمون على نطاق تجارى.

كذلك استخدمت تكنولوجيا الجين المنقول (T.G.) في البكتيريا *E. coli* واستخدامها كمصانع بيولوجية لإنتاج بعض هرمونات الإنسان الهامة مثل الأنسولين والسوماتروبين والسوماتوستاتين ولكن تكلفة إنتاج مثل هذه الهرمونات بواسطة البكتيريا المعدلة جينياً مرتفعة كما تحتاج إلى مهارة كبيرة لذلك أتجه العلماء لإستخدام الماشية المعدلة جينياً لإنتاج مثل هذه الهرمونات لتقليل تكلفة إنتاج هذه الهرمونات ومع ذلك تظل تكلفة إنتاجها مرتفعة.

ونظراً لأن الأبقار المنتجة للألبان تنتج كميات كبيرة من اللبن سنوياً فضلاً عن تواجد الصناعة المتعلقة بإنتاج اللبن وتجميعه لذلك استخدمت هذه الميزة لإنتاج بعض البروتينات والهرمونات الهامة بواسطة الأبقار المعدلة جينياً وكذلك استخدام حيوانات المزرعة الأخرى. ولتحقيق هذا الهدف فإنه يجب وضع الجينات المكونة تحت تحكم جين منظم يسمح بظهور التعبير الجيني للجين المنقول في الغدد الثديية فقط وبذلك سوف ينتج ناتج الجين المنقول أثناء إنتاج اللبن وعلى ذلك فإنه تجرى حالياً في المعامل البحثية المحاولات لإنتاج أبقار معدلة جينياً لإنتاج بعض الهرمونات والبروتينات الهامة بطريقة اقتصادية.

Transgenic goats

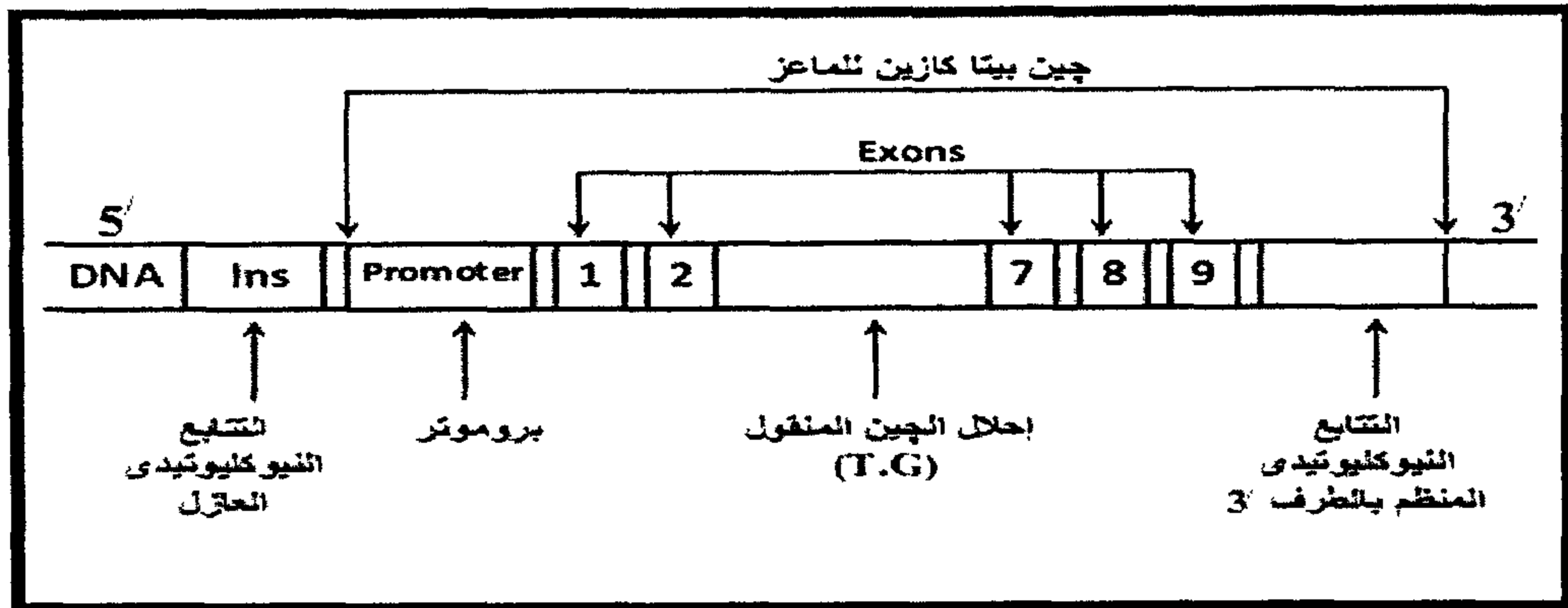
الماعز المعدلة جينياً

استخدمت أيضاً تكنولوجيا نقل الجين في الماعز لإنتاج ماعز معدلة جينياً تقوم بإنتاج بعض المركبات الكيميائية الهامة ذات الأغراض الطبية والتي تستخدم في إذابة جلطات الدم وإنتاج ماعز معدلة جينياً تحتوي على الجين المنقول الذي يجب أن يظهر تعبيره أثناء إفراز اللبن كان باتباع الخطوات التالية (شكل ٧٩)

١- إحلال الجين المنقول (T.G.) محل جزء من جين بيتا كازيين (β -casein) بحيث يحل محل الاكزونات الثالث والرابع والخامس والسادس وما بينهما من أنترونات من هذا الجين الذي يحتوى على تسعة اكزونات.

٢- يضاف للجين المنقول بروجين (Promoter) جين بيتا كازيين (β -casein) والذي ينظم تعبير الجين المنقول بحيث يتم تعبيره في الغدد الثديية فقط أثناء إفراز اللبن ويضاف هذا البروجين إلى الطرف 5' من الجين المنقول (T.G.).

٣- يضاف كذلك للجين المنقول وجوار البرموتور التابع النيوكليوتيدى العازل (Insulator) ويعمل هذا العازل على غلق تأثير العناصر المنظمة الأخرى على التعبير الجينى للجين المنقول والموجودة بالطرف 3' من الجين المنقول.



شكل (٧٩): يوضح الجين المنقول الذى اندمج فى جينوم DNA الماعز لإنتاج ماعز معدلة جينياً وذلك باحلال الجين المنقول بدلاً من الاكزونات الثالث والرابع والخامس والسادس والانترونات الثالث والرابع والخامس والسادس لجين بيتاكازين للماعز بالإضافة إلى بروموتور العازل والتابع النيوكليوتيدى العازل (Insulator) والذى يغلق أى عناصر منظمة أخرى من تأثيرها على الجين المنقول بالطرف 3'.

الطرق البديلة لإنتاج حيوانات معدلة جينياً

Alternative approaches for production of transgenic animals

على الرغم من أن طريقة الحقن النووى الدقيق (Nuclear microinjection) للجين المنقول بالنواة مباشرة كانت أول طريقة استخدمت للحصول على حيوانات معدلة جينياً والتي مازالت تستخدم على نطاق واسع إلا أنه يوجد عديد من الطرق الأخرى البديلة التى تستخدم فى نقل الجين وهى:

(١) استخدام الفيروسات من الطراز رتروفيروسات (Retroviruses) لحمل ونقل الجين وإدماجه فى كروموسومات الخلايا الحيوانية العائله. هذا الطراز من الرتروفيروسات يمكنها مهاجمة الأجنة

المبكرة بما فيها الخلايا الجذعية (Stem cells) الجنينية وهذا الطراز من الفيروسات لا يحتاج إلى مهارة في حقنها للخلايا الحيوانية العائله حيث يحقن هذا الطراز من الفيروسات والتي تحمل الجين المنقول في البويضات المخصبة ثم بعد ذلك تنقل البويضات المخصبة إلى رحم الأمهات الحاضنات للحصول على أجنة حيوانية معدلة جينياً وتستكمل خطوات الحصول على حيوانات معدلة كما سبق ذكره في طريقة الحقن النووي الدقيق. ومن عيوب هذه الطريقة أن هذا الطراز من الفيروسات يحمل كمية محددة من الـ DNA فضلاً عن أن الحيوانات المؤسسة (Founder animals) بواسطة هذه الطريقة دائماً ما تكون كيميرا (Chimaras) ويرجع ذلك إلى دخول الفيروس وما يحمله من الجين المنقول في بعض خلايا الجنين بعد حدوث اندماج النواتين المذكوره والمؤنثة معاً. وعلى ذلك فإنه نادراً ما تستخدم الرتروفيروسات في محاولات تخليق حيوانات معدلة جينياً كاملة. ومع ذلك تستخدم الحيوانات المعدلة جينياً بصورة جزئية في دراسة مقارنة الأنسجة المعدلة جينياً بالأنسجة الطبيعية في نفس الحيوان الذي يحتوى بعض اجزائه على الجين المنقول

(٢) طريقة استخدام الخلايا الجذعية الجنينية (Embryonic stem cells) وفي هذه الطريقة تستخدم خلايا الجذع الجنينية لإنتاج حيوانات معدلة جينياً (T.G.A.). والخلايا الجذعية الجنينية هي خلايا بادئة لتكوين أنسجة معينة من الجسم. وتؤخذ الخلايا الجذعية الجنينية من الجنين في مرحلة مبكرة جداً وهي مرحلة البلاستوسيت (Blastocyte) حيث تحتفظ هذه الخلايا بمقدرتها على النمو إلى أي نسيج جسمي مشتملاً ذلك على النسيج التناسلي (Germline) ويمكن زراعة خلايا الجذع الجينية في مزارع لزراعة الخلايا وإدخال الـ DNA أو الجين المنقول (T.G.) لأي جزء من الخلايا النامية في المزرعة الخلوية. ولنجاح عملية تخليق الحيوانات المعدلة جينياً يجب المحافظة على خلايا الجذع الجنينية تحت ظروف تمنع تشكلها (Differentiated). وبعد ذلك يتم إدخال خلايا الجذع الجنينية المهندسة جينياً في الفجوة المركزية للجنين المبكر في مرحلة البلاستوسيت (شكل ٨٠). ويترتب على ذلك تخليق جنين مختلط (Mixed embryo) والذي ينتج عنه حيوان يحتوى على كيميرا وراثية (Genetic chimera) يتكون من بعض الأنسجة المعدلة جينياً والبعض الآخر أنسجة طبيعية وإذا كان الجنين العائل (Host embryo) وخلايا الجذع الجينية

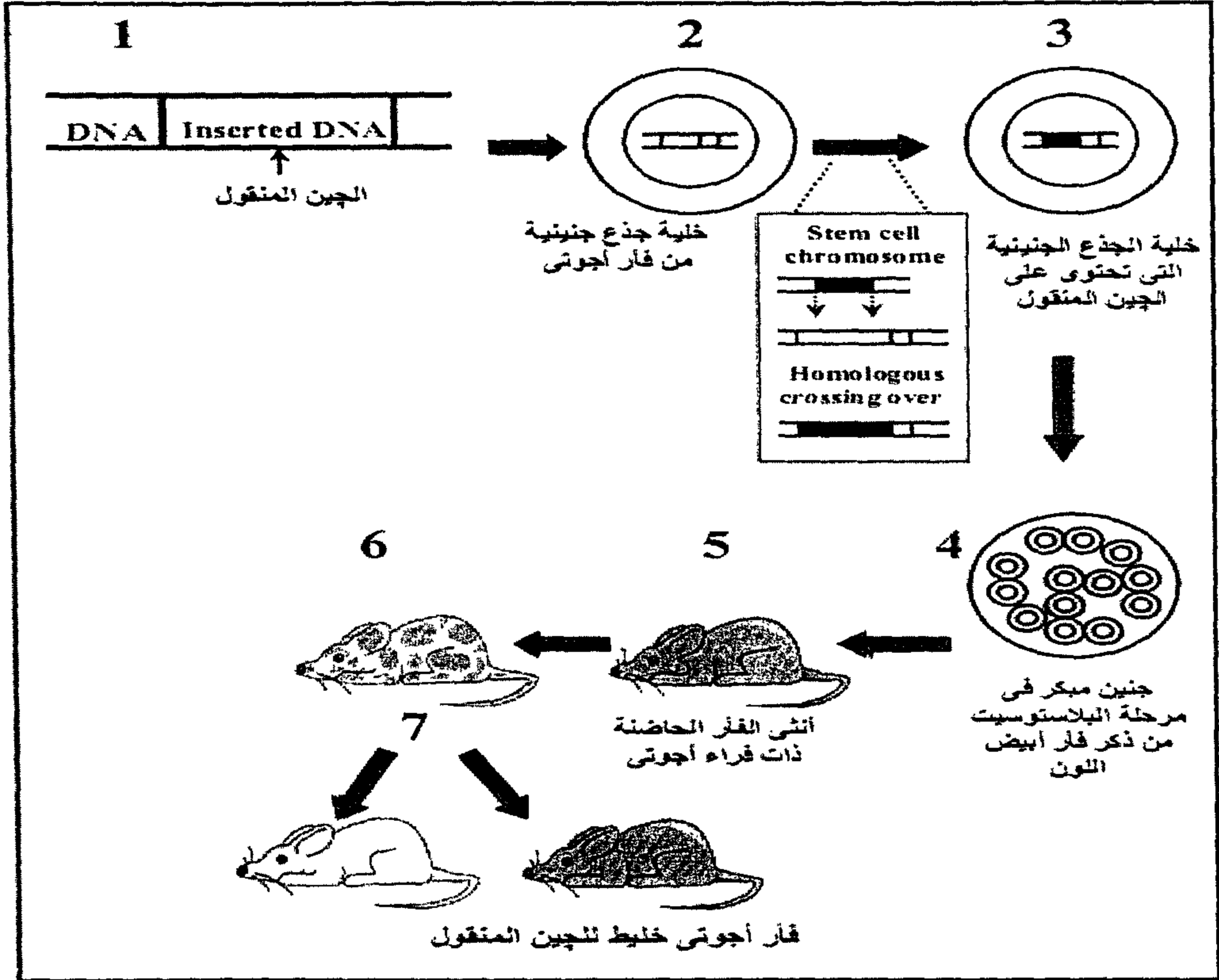
من سلالات مختلفة وراثياً ذات لون فراء مختلف فسوف يتكون حيوان ذو فراء مبقع وهذا يسمح بتحديد المقاطع من الحيوان المعدلة جينياً بكل سهولة. وهذه الحيوانات المؤسسة (Founder) ذات الكيميرا الوراثية يجب أن يحدث تزاوج بينها وبين حيوانات برية (Wild-type) فإذا حدث إدماج للجين المنقول فى الخلايا الجذعية الجنينية التى سوف تعطى النسيج التناسلى (Germline) فإن صفات لون الفراء فى هذه الخلايا سوف تورث إلى النسل. وفى الفئران يستخدم غالباً لون الفراء الأبيض (صفة متنحية) ولون الفراء الاجوتى (اللون البنى) وهى الصفة السائدة للكشف عن الجين المنقول. وعادة ما تؤخذ خلايا الجذع الجنينية من السلالة اجوتى (Agouti). ونظراً لأن لون الفراء الاجوتى هو الصفة السائدة يجعل من السهل اكتشاف وتعقب الخلايا التى عدلت جينياً.

تأثير الموقع على التعبير الجينى للجين المنقول

Location effect on expression of the transgene

غالباً ما يختلف التعبير الجينى للجين المنقول (T.G.) فى الحيوانات والنباتات المعدلة جينياً والتى تحتوى على نفس الجين المنقول إختلافاً كبيراً. كذلك يختلف مستوى التعبير الجينى للجين المنقول فى الأنسجة المختلفة لنفس الكائن سواء نبات أو حيوان. وترجع هذه الإختلافات فى مستوى التعبير الجينى للجين المنقول إلى:

- ١- موقع الجين المنقول بالكروموسوم (DNA). فإذا حدث إدماج له فى منطقة هتروكروماتين (Heterochromatin) يحدث له تعبير جينى ضعيف أو لا يحدث له تعبير جينى تماماً وذلك لأن هذه المناطق من الكروموسومات يكون الـ DNA بها شديد الالتفاف وغالباً ما تضاف مجاميع الميثايل إلى بعض النيوكليوتيدات فى هذه المناطق كما أنها تكون مغطاة بالبروتينات الهستونية (Histones) ومن ثم فإنه عادة لا يحدث نسخ لمثل هذه المناطق من الكروموسومات (شكل ٨١).

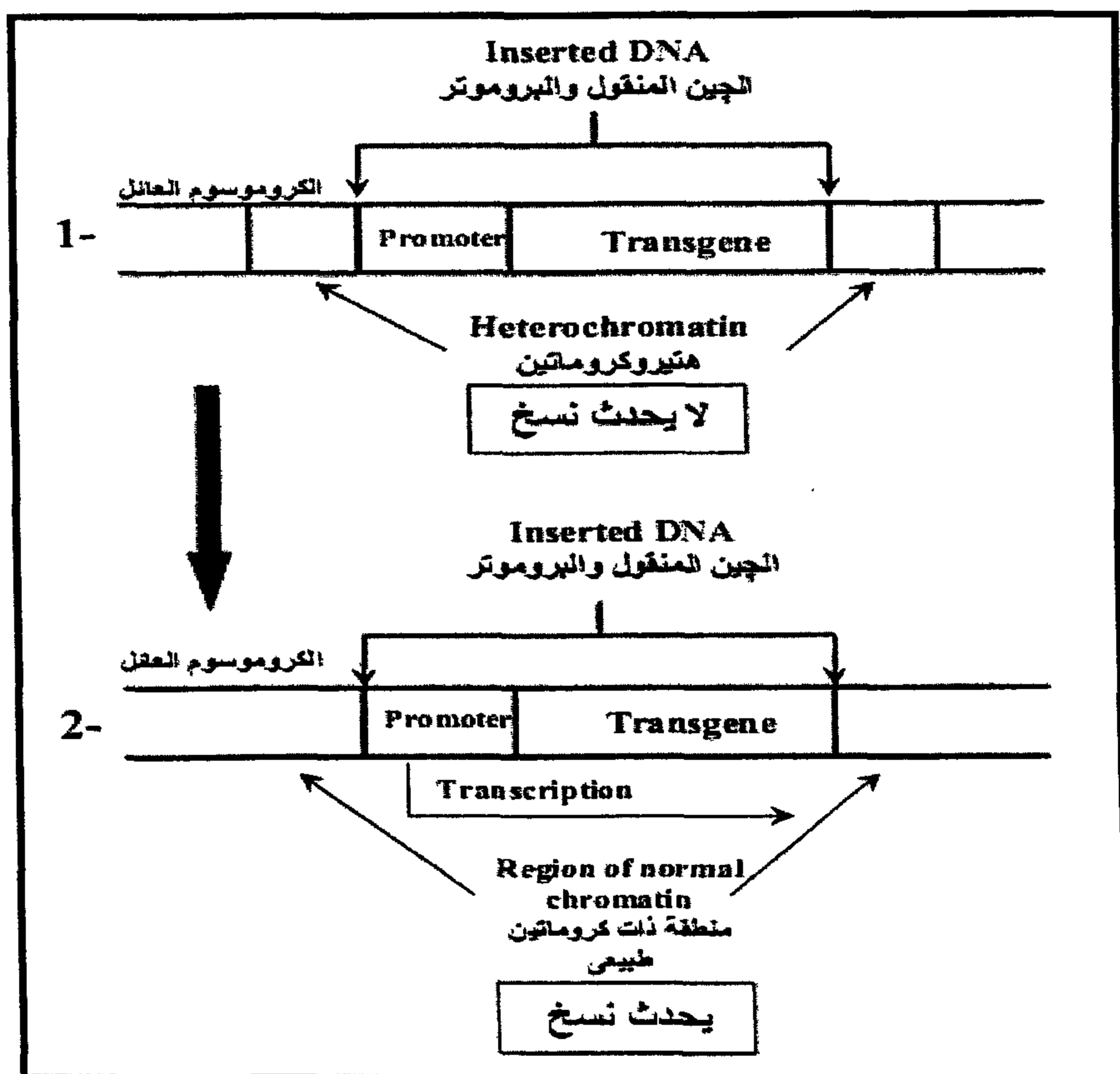


شكل (٨٠): خطوات إنتاج حيوانات معدلة جينياً (T.G.A.) باستخدام خلايا الجذع الجنينية:

- ١- تكوين الـ DNA المهندس جينياً بالجين المراد إدخاله (Inserted DNA) .
- ٢- الحقن الدقيق للـ DNA بداخل خلايا الجذع الجنينية من فأر أجوتى (بنى اللون) .
- ٣- السماح بحدوث العبور المتماثل (Homologous crossing over) بين الجين المنقول وأحد كروموسومات خلية الجذع الجنينية.
- ٤- إدخال خلايا الجذع الجنينية السابقة فى خلايا جنين مبكر فى مرحلة البلاستوسيت لذكر فأر ذو فراء أبيض.
- ٥- إعادة زراعة الجنين السابق فى أنثى فأر ذات حمل كاذب ذات فراء أجوتى.
- ٦- وجود نسل ذكر ذو كيميرا وراثية وهو ذكر أبيض ذو بقع بنية اللون (بنى اللون).
- ٧- تلقيح الذكر السابق بأنثى ذات فراء أبيض وسوف يحتوى النسل الناتج على فأر أجوتى اللون خليط للجين المنقول (Heterozygous) فى الخلايا التناسلية.

٢- موقع الجين المنقول (T.G.) بالنسبة للجينات الأخرى أو التتابعات النيوكليوتيدية التى تعزز التعبير الجينى والتى تتواجد على مسافات متباعدة فى الـ DNA وبالتالى فإنها تؤثر على التعبير الجينى للجين المنقول تبعاً لقرب أو بعد الجين المنقول عن هذه المعززات (Enhancers).

ولقد تأكد هذا التأثير الموضعى باستخلاص الجين المنقول كاملاً من الحيوانات المعدلة جينياً (T.G.A.) والتى لا يحدث فيها التعبير الجينى للجين المنقول وإدخاله وإدماجه فى حيوان آخر والذي يظهر به التعبير الجينى مما يدل على أن الجين المنقول كان سليماً وكاملاً وأن الفشل فى ظهور تعبيره فى الحيوان الأول المعدل جينياً يرجع إلى موقع الجين المنقول فى جينوم (DNA) الحيوان العائل أو الحامل للجين المنقول (T.G.).



شكل (٨١): يوضح تأثير الموقع على التعبير الجينى للجين المنقول

شرح شكل (٨١):

١. إيماج الجين المنقول Transgene بالإضافة إلى البروموتور في منطقة هتيروكروماتين (Heterochromatin) بالكرروموسوم العائل حيث لا يحدث التعبير الجيني للجين المنقول.
٢. إيماج نفس الجين المنقول بالإضافة إلى البروموتور في منطقة تحتوى على كروماتين طبيعى (Normal chromatin) حيث يحدث التعبير الجيني للجين المنقول.

التحكم المتعمد فى التعبير الجينى للجين المنقولDeliberate control of transgene expression

توجد عديد من الحالات التى يكون من المفيد والمفضل ضرورة التحكم فى التعبير الجينى للجين المنقول (T.G.). فالإنتاج الصناعى لبروتين ما يكون من المرغوب حدوث أعلى مستوى من التعبير الجينى للجين الذى ينتج هذا البروتين ولكن ذلك ليس حقيقى دائماً وذلك لأن بعض البروتينات يكون لها تأثير سام عند تواجدها بكميات كبيرة وبالتالي يجب تنظيم عمل هذه الجينات المنقولة عند تخليق هذه الحيوانات المعدلة جينياً لكى تنتج هذه البروتينات بمعدل منخفض. وعندما يكون الهدف من الجين المنقول هو استخدامه فى التحليل الوظيفى فإنه يجب وضعه تحت نظام من التحكم يجعله يعمل (Switch on) أو يتوقف (Switch off) عن العمل . ويعتبر مثل هذا التنظيم فى غاية الأهمية بالنسبة للجينات المنقولة التى يجب أن يظهر تعبيرها الجينى فقط فى بعض الخلايا الخاصة أو عند مراحل معينة من النمو. ويوجد عديد من النظم المتاحة التى تساعد فى التحكم وتنظيم التعبير الجينى للجينات المنقولة منها ما يلى:

Inducible endogenous promoterأولاً: بروموتور العائل التحفيزى

فى الدراسات الأولية التى أجريت لإنتاج حيوانات معدلة جينياً كان يضاف للجين المنقول بروموتور من الحيوان العائل والذى يعرف ببروموتور العائل (Endogenous promoter) والذى يستجيب لمنبهات معينة. فعلى سبيل المثال وضع الجين الذى ينتج هرمون النمو السوماتوتروبين والمأخوذ من الفئران كبيرة الحجم (Rat) فى أحد كروموسومات الفئران صغيرة الحجم من النوع (Mice) وهو الحيوان العائل تحت تحكم بروموتور الجين الذى ينتج بروتين ميتالوثيونين

(Metallothionine) للفئران الصغيرة من النوع Mice (الحيوان العائل) وهذا البروموتور يتم تحفيزه بواسطة العناصر الثقيلة مثل الرصاص والكاديوم والزنك . ومع ذلك يوجد بعض المشاكل المتعلقة بالتأثير السام لهذه العناصر الثقيلة وخاصة إذا كان التحفيز لفترة طويلة.

كذلك فإن بروموتور الصدمة الحرارية (Heat shock promoter) الخاص بالجين (Hsp70) فى الدروسوفيل يعتبر مثال آخر على البروموتور الطبيعى والذى يستخدم فى تنظيم التعبير الجينى للجين المنقول (T.G.) . وهذا البروموتور يكون غير نشط تحت درجة حرارة الغرفة وبزيادة درجة الحرارة إلى ٣٧ °م يحدث تحفيز له ومع ذلك توجد بعض العوائق المتعلقة من استخدام هذا الطراز من البروموتور التحفيزى وهى:

- ١- غالباً ما يحدث تعبير للجين المنقول بمستويات معنوية حتى فى غياب المحفز (Inducer) وأنه غالباً ما يكون التحفيز للجين المنقول بمقدار عشرة أضعاف التحفيز الطبيعى .
- ٢- غالباً توجد تأثيرات جانبية سامة والتى ترجع مباشرة إلى المحفز (مثل الزنك أو درجة الحرارة المرتفعة) أو أنها ترجع إلى تحفيز جينات أخرى طبيعية تستجيب لنفس المحفز.
- ٣- ربما ينفذ المحفز ببطء إلى بعض الأنسجة أو ينفذ فقط إلى بعض أنسجة الكائن. ويمكن التغلب على بعض هذه العقبات باستخدام بروموتورات يتم بنائها صناعياً أو بروموتور معاد توليفه.

ثانياً: نظم البروموتور المعاد توليفه Recombinant promoter systems

تستخدم الجينات البكتيرية المنظمة للتعبير الجينى للجينات البكتيرية لتنظيم التعبير الجينى .
للجين المنقول فى الحيوانات والنباتات المعدلة جينياً ومن هذه الجينات المستخدمة ما يلى:

- (١) الجين الكابت (Repressor gene) لاوبرون اللاكتوز وهو الجين Lac I والذى ينتج البروتين الكابت (Repressor protein) الذى ينظم التعبير الجينى لجينات لاوبرون اللاكتوز فى البكتيريا *E. coli*.

(٢) الجين الكابت لاوبرون المقاومة للمضاد الحيوى التتراسيكلين وهو الجين Tet R الذى ينتج البروتين الكابت (Tet R repressor).

ولاستخدام الجين الكابت lac I فى تنظيم التعبير الجينى للجين المنقول فى الحيوانات المعدلة جينياً يصمم الـ DNA المعاد توليفه بحيث يحتوى على ما يلى (شكل ٨٢):

١- الجين المنقول (T.G.).

٢- الجين الكابت I لاوبرون اللاكتور والذى ينتج البروتين الكابت.

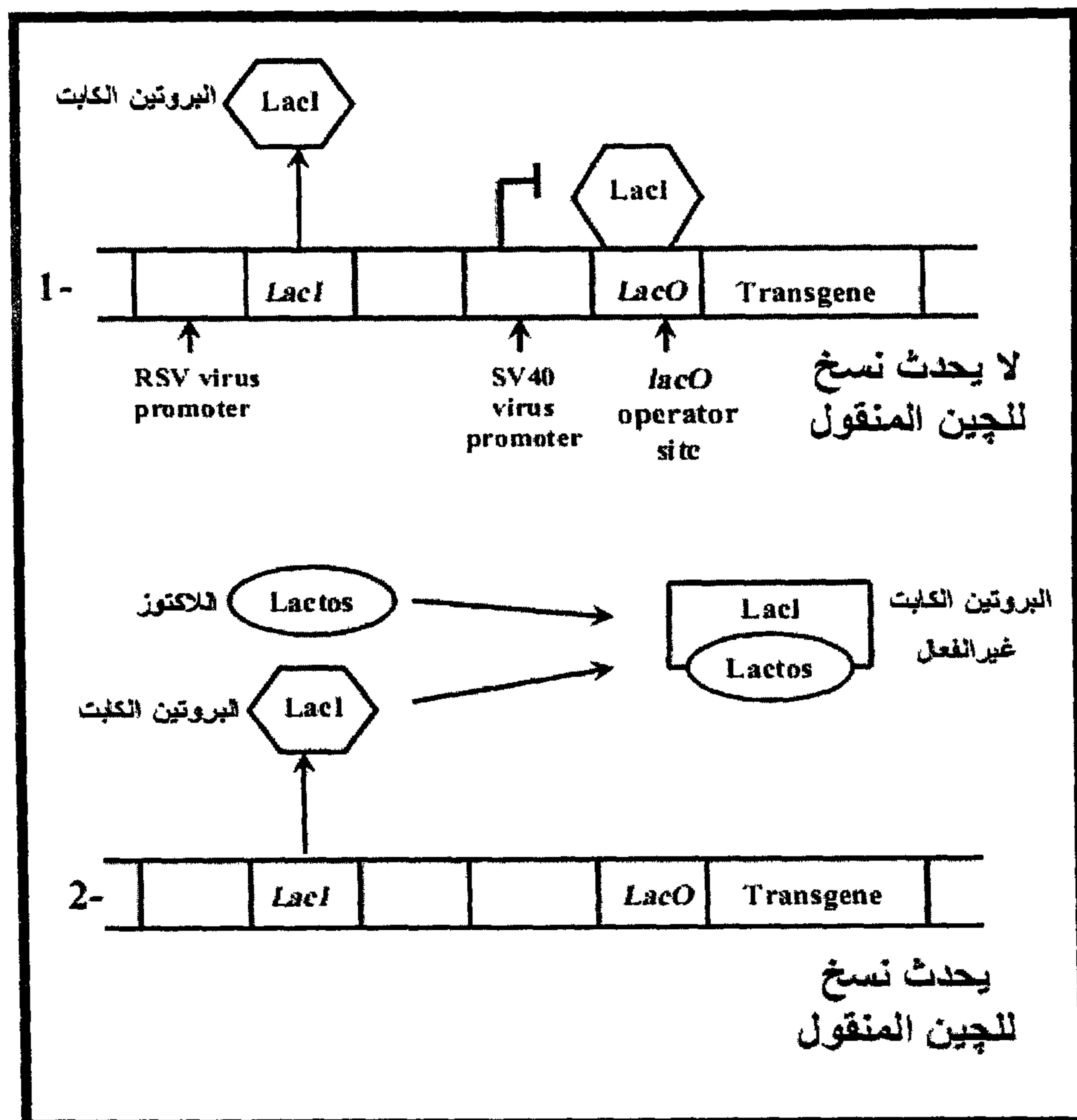
٣- أوبريتور (O) operator لاوبرون اللاكتور.

٤- بروموتور مأخوذ من الفيرس Rousa sarcoma virus (RSV) لضمان التعبير الجينى للجين المنقول فى الخلايا الحيوانية.

٥- بروموتور من الفيرس SV40 (Simian virus 40) للتحكم فى التعبير الجينى للجين المنقول والذى يضاف إلى أوبريتور (Operator) لاوبرون اللاكتور. ويتم تنظيم التعبير الجينى للجين المنقول على النحو التالى:

١- فى غياب المحفز (Inducer) (سكر اللاكتور) يقوم الجين الكابت I (Lac I) بإنتاج البروتين الكابت (Lac I repressor) والذى يرتبط بموقع الأوبريتور وبالتالي يتوقف التعبير الجينى للجين المنقول (شكل ٨٢).

٢- فى وجود المحفز فإنه يرتبط بالبروتين الكابت والموجود بموقع الأوبريتور (O) وبذلك يتحرر الأوبريتور من هذا البروتين الكابت وبذلك يصبح الأوبرون فعال وظيفياً ويحدث التعبير الجينى للجين المنقول.



شكل (٨٢): يوضح تنظيم التعبير الجينى للجين المنقول (T.G.) باستخدام الجينات المنظمة لاوبرون اللاكتوز (Lac operon) على النحو التالى:

١. فى غياب المحفز يدفع البروموتور RSV promoter الجين الكابت lac I لإنتاج البروتين الكابت الذى يرتبط بموقع الاوبريتور (Lac O) وبذلك يصبح الاوبرون متوقف أو غير فعال وظيفياً ولا يحدث تعبير جينى للجين المنقول (T.G.) .

٢. فى وجود المحفز اللاكتوز والذى يرتبط بالبروتين الكابت الذى ينتجه الجين الكابت lac I وبذلك لا يستطيع الارتباط بموقع الاوبريتور (Lac O) وبذلك يصبح الاوبرون فعال وظيفياً ويحدث التعبير الجينى للجين المنقول .

كذلك يستخدم اوبرون المقاومة للمضاد الحيوى التتراسيكلين (Tet operon) فى تنظيم التعبير الجينى للجين المنقول فى الحيوانات المعدلة جينياً ويتم هذا بإدماج الجين المنقول فى هذا الاوبرون (Tet operon) والذى يحتوى على الجين الكابت (Tet R) والذى ينتج البروتين الكابت (Repressor) وينظم تعبير الجين المنقول بارتباط البروتين الكابت بموقع الاوبريتور (O) وذلك فى غياب المحفز (التتراسيكلين) يصبح الاوبرون غير فعال وظيفياً ويتوقف تعبير الجين المنقول بينما عند إضافة المحفز (التتراسيكلين) يقوم بتحرير الاوبريتور من البروتين الكابت وبذلك يصبح الاوبرون (Tet operon) نشط وظيفياً ويحدث التعبير الجينى للجين المنقول.

ويعمل كلاً من النظامين السابقين جيداً فى الكائنات حقيقية النواة حيث ينتج كلاً النظامين تعبير عالى للجين المنقول تحت النظام التحفيزى خاصة النظام الثانى والذى ينتج ٥٠٠ ضعف من ناتج الجين المنقول ولكن من أحد مشاكل هذين النظاميين هى الحاجة إلى معدل ثابت من التعبير الجينى لكلا الجينين الكابتين (Lac I gene) , (Tet R gene) والليذان ينتجان البروتينات الكابتة التى ترتبط بموقع الاوبريتور لتنظيم التعبير الجينى للجين المنقول لأنه ربما يكون لهذه البروتينات الكابتة تأثير سام على الخلايا حقيقية النواة عند تواجدها بمستويات عالية ومع ذلك أمكن تحويل وتعديل النظام المستخدم فيه التتراسيكلين كمحفز لاستبعاد إنتاج المستوى العالى من البروتين الكابت الذى ينتجه الجين الكابت (Tet R) ولقد تم إعادة بناء حاملات (Vectors) الجينات المنقولة البلازميدية وكذلك الحاملات الفيروسية بكل مكونات نظام اوبرون المقاومة للمضاد الحيوى التتراسيكلين (Tet operon) بالإضافة إلى الجين المنقول وکلونتها (Cloning) فى الحيوان المراد تعديله جينياً.

ثالثاً: تنظيم التعبير الجينى للجين المنقول عن طريق مستقبلات هرمون الاسترويد

Transgene regulation via steroid receptors

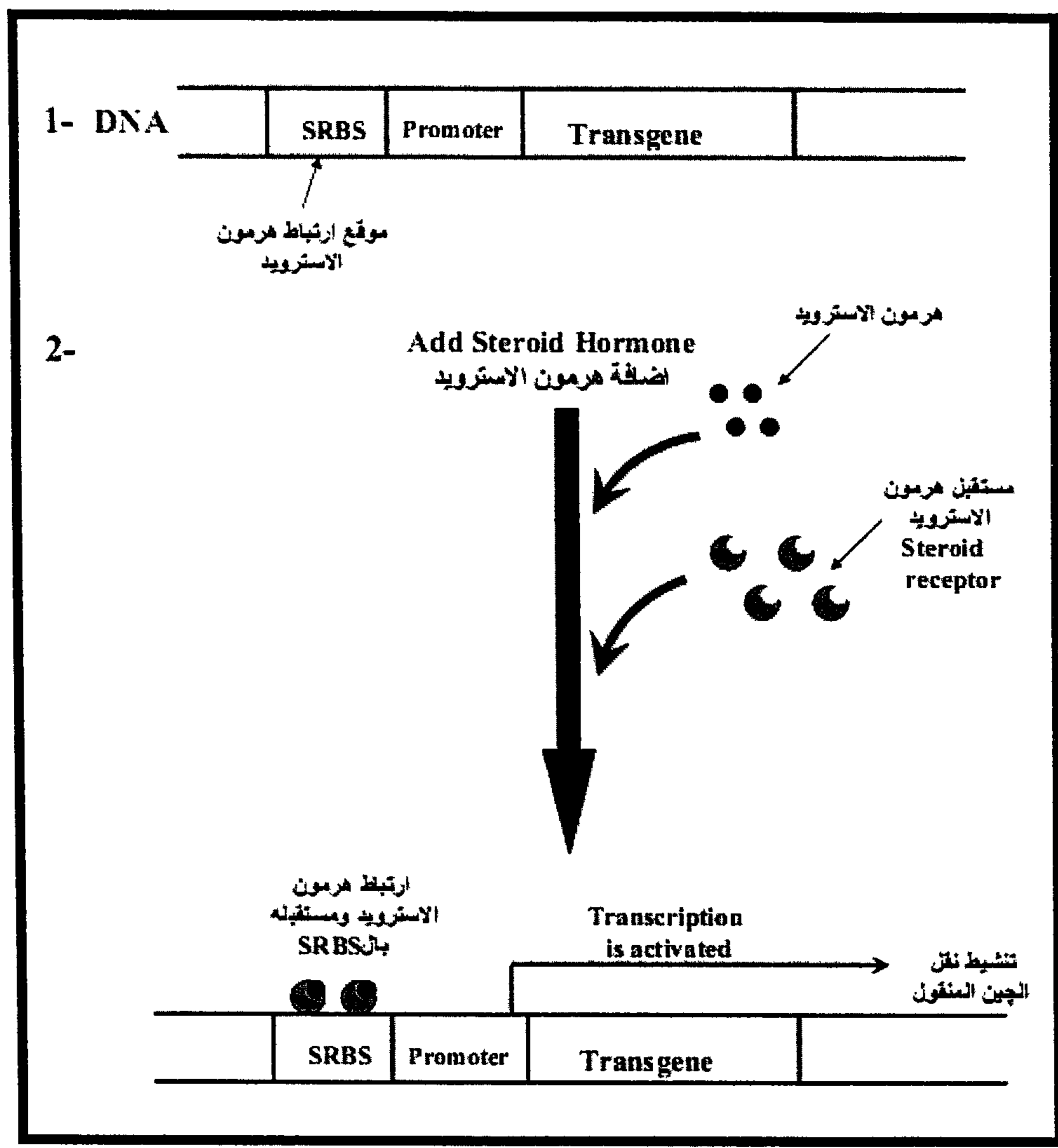
من بين أحد مشاكل استخدام جزيئات المضاد الحيوى التتراسيكلين كمحفز لتنظيم التعبير الجينى للجين المنقول (T.G.) أنها غالباً ما تنفذ إلى الأنسجة بطريقة غير متساوية بينما تنفذ جزيئات هرمون الاسترويد من الأغشية الخلوية بصورة سريعة وأنه بمجرد دخولها داخل الخلية

ترتبط بالبروتينات المستقبلية الموجودة بالخلية والتي توجه جزيئات هرمون الاسترويد للارتباط مباشرة بالـDNA وبالتالي يمكن استخدامها فى تنظيم التعبير الجينى للجين المنقول فضلاً عن أنه يحدث إزالة لجزيئات هرمون الاسترويد خلال عدد قليل من الساعات وعلى ذلك فإنها تعتبر أكثر أهمية لتحفيز التعبير الجينى للجين المنقول. ومع ذلك يوجد جدل حول استخدام هذا الهرمون تتعلق بتحفيزه التعبير الجينى لجينات العائل الأخرى والتي تستجيب لهذا الهرمون. وأحد الطرق المستخدمة لتجنب تأثيره فى تحفيز جينات العائل الأخرى هو استخدام هرمون استرويد لا يوجد بصورة طبيعية فى الحيوان العائل المراد تعديله جينياً مثل استخدام هرمون اكديسون (Ecdysone) والمعزول من الحشرات لتنظيم التعبير الجينى فى الثدييات أو الحيوانات المعدلة جينياً وكذلك العكس صحيح وهو استخدام هرمون جليكوكورتيكويد (Glucocorticoid) المعزول من الثدييات لتنظيم التعبير الجينى فى الحشرات والنباتات المعدلة جينياً وعلى ذلك يجب أن يحتوى بناء قطعة الـDNA التى تستخدم لهذا الغرض على ما يلى:

١- الجين المنقول (T.G.).

٢- البروموتور الخاص بالجين المنقول.

٣- قطعة الـDNA التى يرتبط بها هرمون الاسترويد والمعروفه باسم Steroid Receptor Binding Site (SRBS) ولتنظيم التعبير الجينى للجين المنقول بواسطة هرمون الاسترويد يكون بمعاملة الحيوان المعدل جينياً بهرمون الاسترويد والذي ينفذ عبر الغشاء الخلوى ويرتبط بالبروتين المستقبل الخاص به ثم بعد ذلك ينتقل المركب المكون من الهرمون ومستقبله إلى النواة ليرتبط ببروموتور الجين المنقول ومن ثم يظهر التعبير الجينى للجين المنقول (شكل ٨٣).



شكل (٨٣): يوضح تنظيم التعبير الجيني للجين المنقول (T.G.) بواسطة هرمون الستيرويد.

١- الـ DNA الذي يحتوي على الجين المنقول (T.G.) والبروموتور (Promoter) وموقع ارتباط هرمون الستيرويد

٢- إضافة هرمون الستيرويد والذي يرتبط بالمستقبلات ويتحول إلى جزيئات مزدوجة (Dimers) تستطيع الارتباط بموقع الارتباط (SRBS) بالـ DNA وبذلك يحدث تنشيط لنسخ الجين المنقول.

Transgenic insects (T.G.I.)الحشرات المعدلة جينياً

يوجد عديد من أنواع الحشرات المعدلة جينياً (T.G.I.) ومن بينها حشرة الدروسوفيلا والتي درست على المستوى الجزيئى لفترة طويلة مما جعلها متاحة لإدخال الجين المنقول إلى كروموسومات هذه الحشرة. ولقد أوضحت وأكدت الدراسات على تنقل بعض قطع الـDNA الكروموسومى من مكان لآخر داخل جينوم (DNA) هذه الحشرة وكذلك فى حشرات أخرى والتي تعرف بالعنصر المتنقل P. والحشرات التى تحتوى على العنصر المتنقل P يكون تكرار تنقله منخفض جداً بسبب تخليق البروتين الكابت (Repressor) الذى توجد شفراته على العنصر P. وعندما يجرى التزاوج بين ذكور تحمل العنصر (P) وإناث لا تحمله يرتفع معدل تكرار قطع الـDNA المتنقلة بصورة كبيرة فى البيض المخصب لفترة قصيرة من الوقت وذلك لنقص البروتين الكابت. ويسبب الانتقال العشوائى للعنصر P بين الكروموسومات معدل مرتفع من الطفرور ونسبة منخفضة من النسل الطبيعى.

ويوجد على جانبى العنصر (P) ما يقرب من ٣١ زوج من المكررات المعكوسة (Inverted repeats) والتي يمكن إدخال الجين المنقول بينها وبذلك يمكنه أن يتنقل من مكان لآخر وعلى ذلك فإن هندسة العنصر (P) بالجين المنقول يصبح من الممكن استخدامه كحامل (Vector) فى نقل الجين المنقول بين سلالات حشرة الدروسوفيلا أو بين أنواع أخرى من الحشرات كذلك يمكن استخدام طريقة الحقن الدقيق للجين المنقول فى أجنة سلالات من الدروسوفيلا لا تحتوى على العنصر المتنقل P. وفى حشرة الدروسوفيلا تنقسم نواة الجنين الثنائية الناتجة من اندماج نواة الحيوان المنوى الأحادية بنواة البيضة الأحادية انقسامات ميتوزية عديدة دون حدوث الانقسام الخلوى وينتج عن ذلك تكون خلية عملاقة (Giant cell) تحتوى على عديد من الأنوية الثنائية وتعرف باسم سينسيتيم (Syncytium) وعادة يجرى الحقن الدقيق للجين المنقول فى هذه المرحلة حيث يحدث إدماج للجين المنقول فى أحد هذه الأنوية الثنائية والتي تنقسم وتنمو لتعطى أنسجة من بينها بادئات النسيج التناسلى (شكل ٨٤). ويمكن إدخال الجين المنقول من الناحية العملية فى حشرة

الدروسوفيلا بواسطة العنصر المتنقل (P) من خلال حمله بواسطة بلازميد بكتيرى. وعملياً يستخدم فى ادخال الجين المنقول فى جينوم DNA حشرة الدروسوفيلا بلازميديين معاد توليفهما هما:

١- البلازميد المساعد (Helper plasmid) والذى يحمل الجين الذى ينتج إنزيم Transposase كما يحمل هذا البلازميد العنصر P الذى يحتوى على نقص جزئى فى أحد المكررات المعكوسة ولكنه ينتج إنزيم Transposase الفعال وظيفياً (شكل ٨٤) وبذلك فإنه لا ينتقل بنفسه إلى كروموسومات الحشرة العائلة.

٢- البلازميد الحامل (Vector plasmid) ويحتوى على الجين المنقول (T.G.) بالإضافة إلى الجين المخبر أو الجين الكاشف (Markers gene) وهو جين لون العين الحمراء ينقصه جين إنتاج إنزيم Transposase وبذلك يعتمد تنقل العنصر P الذى يحمل الجين المنقول على البلازميد المساعد. وبمجرد ان يحدث ادماج العنصر P وما يحمله من الجين المنقول فى موقع معين من كروموسوم الحشرة فإنه لا ينتقل فى الاجيال التالية لعدم احتوائه على الجين الذى ينتج إنزيم Transposase وبالتالي سوف يورث بطريقة ثابتة. ويمكن الكشف عن العنصر P وما يحمله من الجين المنقول باستخدام الجينات الكاشفة maker genes مثل جين المقاومة للمضاد الحيوى النيوميسين (Neomycine) او استخدام جينات لون العين للتحقق من وجود العنصر P وما يحمله من الجين المنقول. فاذا كان جين لون العين الحمراء هو الجين الكاشف فإن نسل الحشرات المعدلة جينياً حمراء العين تدل على ان الجين المنقول قد تم ادماجه فى النسيج التناسلى وبالتالي فإن كل خلايا النسل المعدل جينياً سوف تحتوى على الجين المنقول (Transgene) (شكل ٨٤). وتتلخص خطوات الحصول على حشرات معدلة جينياً فيما يلى:

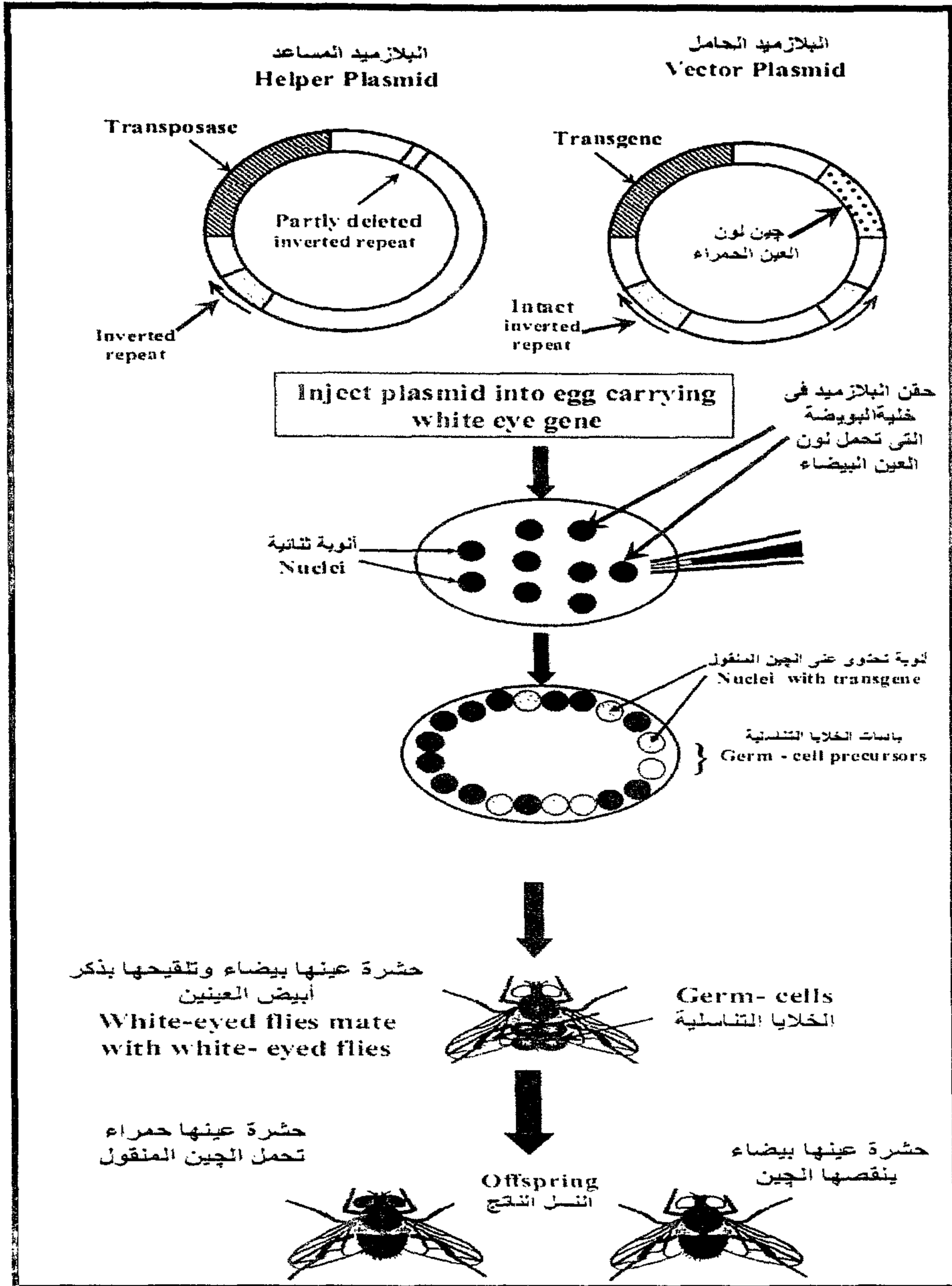
١. حقن البلازميديين السابقين فى الطرف الخلفى لخلية البيضة المخصبة التى تحمل جين لون العين البيضاء تحتوى ما بين ٢٠٠ إلى ٤٠٠ نواة ثنائية داخل نفس الغشاء الخلوى وإنتاج إنزيم Transposase بواسطة البلازميد المساعد الذى يحفز الانتقال العشوائى للجين المنقول والجين الكاشف فى كروموسومات مختلفة فى الأنوية المختلفة وقد يحدث هذا الادماج فى أنوية خلايا النسيج التناسلى (Germ line).

٢. يسمح لخلية البيضة بالنمو وتكوين حشرة كاملة النمو وستكون ذات عينين لونهما بيضاء (white eyes) والناجمة من تزاوج ذكر وانثى عيניהما بيضاء.

٣. تزاوج الحشرة السابقة مع حشرة أخرى من نفس النسل ذات عينين لونها بيضاء فإذا ظهر بالنسل حشرات ذات عينين لونها حمراء (الجين الكاشف) فإن ذلك يدل على نجاح ادخال الجين المنقول (Transgene) فى الخلايا التناسلية (Germ line)

إنتاج أغنام معدلة جينياً Production of transgenic sheep

أمكن باستخدام تكنولوجيا نقل الجين إنتاج أغنام مهندسة جينياً بإدخال الجين البشري المسئول عن تخليق البروتين البشري المعروف باسم α -1-antitrypsin فى نواة الإسبرم الموجودة فى خلية البيضة المخصبة وقبل اندماجها مع نواة البيضة لتكوين الزيجوت. وبعد انقسام خلية البيضة المخصبة (الزيجوت) عدة انقسامات لتكوين كتلة من الخلايا وذلك فى المعمل نقلت هذه الكتلة من الخلايا إلى رحم الأم الخاضعة ليكتمل نمو الجنين وفى النهاية ولدت الأم الخاضعة هذا الحيوان المعدل جينياً والذي يحمل الجين المرغوب وبذلك تستطيع هذه الأغنام المعدلة جينياً من إفراز هذا البروتين البشري فى ألبانها. وهذا البروتين يثبط عديد من إنزيمات هدم البروتينات proteases والذي يستعمل فى علاج حالات إنتفاخ الرئة (Emphysema) وكذلك تليف الكبد (Cirrhosis).



شكل (٨٤): يوضح خطوات إنتاج حشرات معدلة جينياً (T.G.I.) باستخدام نوعين مختلفين من البلازميدات المعاد توليفها بالجين المنقول والجين المخبر أو الجين الكاشف (Marker gene)

إنتاج أبقار معدلة جينياً Production of transgenic cows

استطاع العالم Ian Wilmut ومعاونيه إنتاج بقرة معدلة جينياً سميت باسم روزي (Rosie) تقوم بإفراز البروتين البشري المعروف باسم Alpha lactalbumin وذلك بإدخال الجين الذي ينتج هذا البروتين في أحد كروموسومات نواة الإسبرم الموجود في خلية البويضة المخصبة وقبل اندماجها بنواة البويضة وتمكن هذا العالم ومعاونيه من الحصول على هذه البقرة المعدلة جينياً بالجين الذي ينتج هذا البروتين البشري حيث يفرز هذا البروتين مع إفراز اللبن. وهذا البروتين يحتوي على كل الأحماض الأمينية تقريباً والتي يحتاج إليها الأطفال حديثي الولادة ويجرى تنقية هذا البروتين من الكبد ويباع في صورة مسحوق يستعمل في تغذية الأطفال الذين يولدوا غير مكتملي النمو والمعروفين بالأطفال المبتسرين.

كذلك استطاعت إحدى شركات التقنية الحيوية في نيوزيلاندا من إنتاج أبقار معدلة جينياً باستخدام نفس الطريقة السابقة. وكانت هذه الأبقار المعدلة جينياً تحمل نسخ إضافية من الجينين اللذان ينتجان نوعين من بروتين اللبن وهما بيتا كازين β -casein وكابا كازين K-casein. ووجد أن هذه الأبقار المعدلة جينياً تنتج ألباناً ارتفعت فيها نسبة البروتين بيتا كازين بنسبة ٨% كما ارتفعت نسبة البروتين كابا كازين إلى الضعف كما ارتفعت النسبة الكلية لبروتين اللبن بمقدار ١٣% مقارنة بألبان الأبقار غير المعدلة جينياً. وبمتابعة هذه الأبقار المعدلة جينياً وجد أنها ظلت خلالها نسبة البروتين الكلي في اللبن مرتفعة. ومما لاشك فيه أن الألبان ذات المحتوى المرتفع من البروتين سوف تؤدي إلى انخفاض تكلفة إنتاج منتجات الألبان مثل الجبن والزبادي وذلك لأن ارتفاع نسبة البروتين باللبن سوف يؤدي إلى استخدام كمية أقل من اللبن لإنتاج نفس كمية الجبن مقارنة بمثيلاتها من الألبان العادية الناتجة من الأبقار غير المعدلة جينياً.

وفي الوقت الحالي تجرى محاولات عديدة لاستخدام الأبقار والأغنام والماعز والأبل لإنتاج حيوانات معدلة جينياً تنتج في ألبانها أحد العقاقير أو أحد الأمصال أو أحد الهرمونات البشرية والتي تستخدم في مقاومة وعلاج بعض الأمراض الوراثية في الإنسان.

الدواجن المعدلة جينياً Transgenic Poultry

تستخدم طرق التربية التقليدية لتحسين الدواجن وذلك بالتهجين بين السلالات التي تحتوي على الجينات المرغوبة وتلك التي تحتوي على جينات غير مرغوبة متبوعاً بالانتخاب للأفراد التي تحمل توليفة اعتباطية من الجينات المرغوبة. وهذه الطريقة من طرق التربية التقليدية من التهجين والانتخاب لأفضل التراكيب الجينية تحتاج إلى سنوات عديدة وتكلفة كبيرة. فعلى سبيل المثال إذا كانت هناك سلالات من الدواجن بها كل الصفات المرغوبة ولكن ينقصها صفة المقاومة لأحد الأمراض وتوجد سلالة أخرى تحمل الصفات الرديئة لمعظم صفاتها التجارية ولكنها مقاومة وراثياً لهذا المرض. وعلى ذلك فإن التهجين بينهما ينتج عنه نسلًا يحتوي على كل الصفات الموجودة في السلالتين وباستخدام طريقة التربية بالتهجين الرجعي بين أفراد الجيل الأول والسلالة الجيدة يمكن الحصول في النهاية على سلالة تحمل الصفات المرغوبة بالإضافة إلى الصفة الوراثية المقاومة للمرض. ومع ذلك فإن هذه الطريقة من طرق التربية التقليدية تحتاج إلى سنوات طويلة وتكلفة كبيرة.

ولكن باستخدام تكنولوجيا نقل الجين وطرق الهندسة الوراثية فإنه يمكن عزل وفصل الجين المرغوب الذي يتحكم في صفة المقاومة لأحد الأمراض وإدخاله في أحد كروموسومات دجاجة بها جينات الصفات المرغوبة. وتجرى هذه العملية بحقن وإدخال الجين المرغوب (جين المقاومة للمرض) في خلية البويضة المخصبة بنواة الإسبرم وقبل اندماج النواتين (نواة الإسبرم ونواة البويضة) معاً لتكوين الجنين وبذلك ستكون كل وجميع الخلايا الناتجة والمكونة لجسم الدجاجة بما فيها النسيج التناسلي تحتوي على الجين المرغوب أو الجين المنقول وتصبح الدجاجة الناتجة معدلة جينياً (Transgenic poultry) ومنها يمكن الحصول على سلالة من الدجاج معدلة جينياً بالجين المرغوب. وتستغرق هذه العملية وقتاً قصيراً وذلك بالمقارنة لطرق التربية التقليدية.

ومن ناحية أخرى فإن العقبات التي تواجه إنتاج دواجن معدلة جينياً باستخدام طرق التقنية الحيوية هي صعوبة الحصول على خلية البويضة المخصبة لهشاشتها واحتوائها على كميات كبيرة

من المَح (Yolk) والذي يعيق الوصول إلى خلية البويضة المخصبة لذلك يلجأ الباحثون إلى استخدام طريقة بديلة وهي التعامل مع الجنين في المرحلة الجنينية المبكرة وهي مرحلة البلاستودرم (Plastoderm) حيث يتم عزل الجين المرغوب في هذه الخلايا باستخدام طرق التقنية الحيوية المتبعة في ذلك وبذلك نحصل على خلايا معدلة جينياً بالجين المرغوب والتي يتم زراعتها بجوار خلايا البلاستودرم لجنين السلالة المراد تحسينها وراثياً وتصبح جزء من هذا الجنين والتي تنقسم مع انقسامات خلايا الجنين لتكوين جسم الفرد الجديد الناتج من نمو هذا الجنين وبذلك يصبح جسم الدجاجة الناتجة من ذلك يحتوي على أنسجة غير معدلة جينياً وأخرى معدلة جينياً ومثل هذا الكتكوت وما ينشأ عنه من دجاجة تعرف بالدجاجة الكيميرية (Chimeric chicken). وإذا حدث إن نشأت الأنسجة التناسلية (المبيض والخصية) من الخلايا المعدلة جينياً فإن ذلك يضمن انتقال الصفة الجديدة (الجين المنقول) إلى النسل الناتج وبذلك يتحقق الوصول إلى سلالة من الدجاج المعدل جينياً تحمل الجين المرغوب.

ومن الصفات التي يمكن تحسينها باستخدام التقنيات الحيوية والهندسة الوراثية في الدواجن صفات عديدة منها الصفات التي تتحكم في زيادة معدل النمو وعدم تخزين الدهن وزيادة القدرة الهضمية وتوسيع نطاق المواد الغذائية التي تستطيع هضمها وكذلك تخزين عديد من العقاقير الطبية الدوائية من المبيض.

ولقد تم إنتاج أول دجاجة معدلة جينياً باستخدام تقنيات الهندسة الوراثية في بريطانيا بإدخال الجين الذي ينتج هرمون النمو والمتحصل عليه من الأبقار وسميت هذه السلالة المعدلة جينياً بهذا الهرمون باسم الدجاجة الفائقة (Super-chicken) وذلك في التسعينات من القرن العشرين. كذلك تستهدف تكنولوجيا نقل الجين إلى الدجاج تلك الجينات المتعلقة بزيادة القدرة الهضمية وزيادة نطاقها ومنها تلك الجينات التي تنتج إنزيمات تحليل السيلولوز (Cellulose) وإنزيم تحليل الدهون (Lipase).

وتجرى حالياً محاولات إنتاج دواجن معدلة جينياً بإدخال الجين المرغوب إلى نواة الحيوان المنوي لتقوم بنقل الجين المرغوب إلى نواة البويضة بعد حدوث الإخصاب وبذلك نحصل على جنين معدل جينياً بالجين المرغوب والذي يعطي في النهاية دجاجة معدلة جينياً. ولقد تقدمت بحوث

وتقنيات الهندسة الوراثية في مجال الدواجن حتى أصبح العديد من العلماء المشتغلين في هذا المجال على قناعة من أنه في خلال السنوات القليلة القادمة سوف يكون هناك سلالات من الدواجن معدلة جينياً ومتاحة على النطاق التجاري.

مخاطر الدواجن المعدلة جينياً

على الرغم من أن إنتاج دواجن معدلة جينياً تحمل في طياتها كثير من الخير إلا أنه يجب الأخذ في الاعتبار ما قد ينتج عن نقل الجين إلى الدواجن بعض السلبية. فعلى سبيل المثال ينتج عن إنتاج دواجن معدلة جينياً بهرمون النمو زيادة في وزن الدجاج مما يترتب عليه تحميل أرجل الدجاج بهذه الأوزان الزائدة مما يترتب عليه ارتفاع نسبة الإصابة بمرض عسر الهيكل الغضروفي لعظام الأرجل والمعروف باسم Tibial dyschondroplasia وهو حالة مرضية تصيب عظام الأرجل الصغيرة يصيبها بالشروخ والكسور مما يعيق حركة الدجاجة وكذلك ارتفاع معدل موت الدجاج ونشوء بعض الحالات المرضية مثل تلك المرتبطة باستخدام الرتروفيروسات (Retroviruses) كحامل للجين المرغوب والتي تتمثل في ارتفاع نسبة ظهور سرطان الدم والغدد الليمفاوية في الدواجن المعدلة جينياً وهي اعتبارات يمتلك العلم والعلماء أدوات التحكم فيها.

استنساخ ذكور الفئران من خلايا قمة الذيل البالغة

Cloning of male mice from adult tail-tip cells

في العقد الأخير من القرن العشرين تم بنجاح استنساخ الحيوانات من الخلايا الجسمية البالغة في الأغنام والفئران والأبقار. وكل هذه الحيوانات المستنسخة السابقة والمشتقة من الحيوانات البالغة تم استنساخها باستخدام خلايا الغدد التناسلية البالغة أو باستخدام بعض الخلايا الجسمية للنسيج التناسلي وذلك من خلال الاستزراع النووي لأنوية الخلايا الجسمية من الحيوانات الواهبة في خلايا البويضات (Egg cells) منزوعة النواة.

وفي عام ١٩٩٩ استطاع العالمين Ryuzo Yanagimachi و Teruhikow Kayama

استنساخ ذكور الفئران باستخدام خلايا قمة الذيل البالغة من الذكور وتتلخص هذه الطريقة في النقاط التالية:

- ١- استخدام إناث من الفئران ذات فراء أسود عمرها ما بين ثمانية إلى عشرة أسابيع وتحفيزها من أجل التبويض للحصول منها على خلايا البويضات الأولية (Oocytes).
- ٢- أزيلت كروموسومات الدور الاستوائي الثاني (Metaphase II) من خلايا البويضات الدولية وبذلك تصبح هذه الخلايا عديمة النواة.
- ٣- عزلت الخلايا الواهة للأنوية الجسمية من خلايا قمة الذيل من فأر ذكر بالغ نو فراء أجوتي عمره ما بين ١٠ إلى ١٢ أسبوع وعزل الأنوية الثنائية من هذه الخلايا الجسمية.
- ٤- إجراء الحقن الدقيق (Micro injection) بكل نواه من هذه الأنوية المأخوذة من خلايا قمة الذيل بكل خلية من خلايا البويضات الأولية منزوعة النواة والسماح لهذه الخلايا بالنمو على بيئة خاصة لتكوين الأجنة.
- ٥- نقل الأجنة المتكونة والتي تحتوي ما بين خليتين إلى ثمانية خلايا وهي مرحلة البلاستوسيست (Blastocyste) إلى رحم الأم الحاضنة (Foster matter) وكانت ذات فراء أبيض.
- ٦- وجد أنه ما بين ٥٠% إلى ٥٨% من خلايا البويضات الأولية منزوعة النواه والتي حقنت بالأنوية المأخوذة من خلايا قمة الذيل للذكر الواهب نمت حتى البلاستوسيست وذلك في أنبوبة الإخصاب (In vitro).
- ٧- وجد أنه من بين ٢٧٤ حالة من الأجنة المتكونة في أنبوبة الاختبار والتي تم نقلها إلى رحم الأمهات الحاضنات إن ثلاثة أجنة فقط هي التي استكملت نموها ووصلت إلى مرحلة النمو النهائية داخل رحم الأمهات الحاضنات وبعد الوضع ظلت هذه الفئران الثلاثة في الحياة وكانت جميعها ذات فراء أجوتي وهو لون فراء الذكر الواهب للخلايا الجسمية والتي استخدمت في الاستنساخ.

ولقد أوضحت هذه الدراسة أن استنساخ الحيوانات باستخدام الخلايا الجسمية البالغة ليس محدداً بالإناث أو باستخدام الخلايا الجسمية للنسيج التناسلي للإناث وأنه يمكن استنساخ الذكور أيضاً باستخدام الخلايا الجسمية وعلى ذلك فإنه يمكن تخزين جينومات (Genomes) الفئران في صورة خلايا جسمية بالغة مثل خلايا قمة الذيل بصورة أفضل من استخدام الجاميطات أو الزيجوتات أو الأجنة.

الباب العاشر

هندسة جينات الكائنات حقيقية النواة فى البكتيريا

Engineering Eukaryotic Genes In Bacteria

تستخدم حالياً البكتيريا وخاصة بكتيريا القولون (*E. coli*) المهندسة جينياً ببعض الجينات التى مصدرها الكائنات حقيقية النواة كمصانع بيولوجية لإنتاج بعض الهرمونات والبروتينات الهامة بكميات كبيرة وضخمة وبطريقة اقتصادية . ويستخدم البلازميدات البكتيرية (Bacterial plasmid) كحاملات (Vectors) لنقل وإدخال الجين المكلون (C.G.) Cloned gene فى البكتيريا العائله. والبلازميدات البكتيرية هى جزيئات دائرية من الـDNA مزدوجة الخيط. وتستخدم البلازميدات البكتيرية لنقل وإدخال الجين المكلون (C.G.) بعد اعادة توليفها مرة أخرى وتكوين ما يعرف بالبلازميد المعاد توليفه (R.P.) والتى يجب أن تصمم بحيث تحتوى على ما يلى:

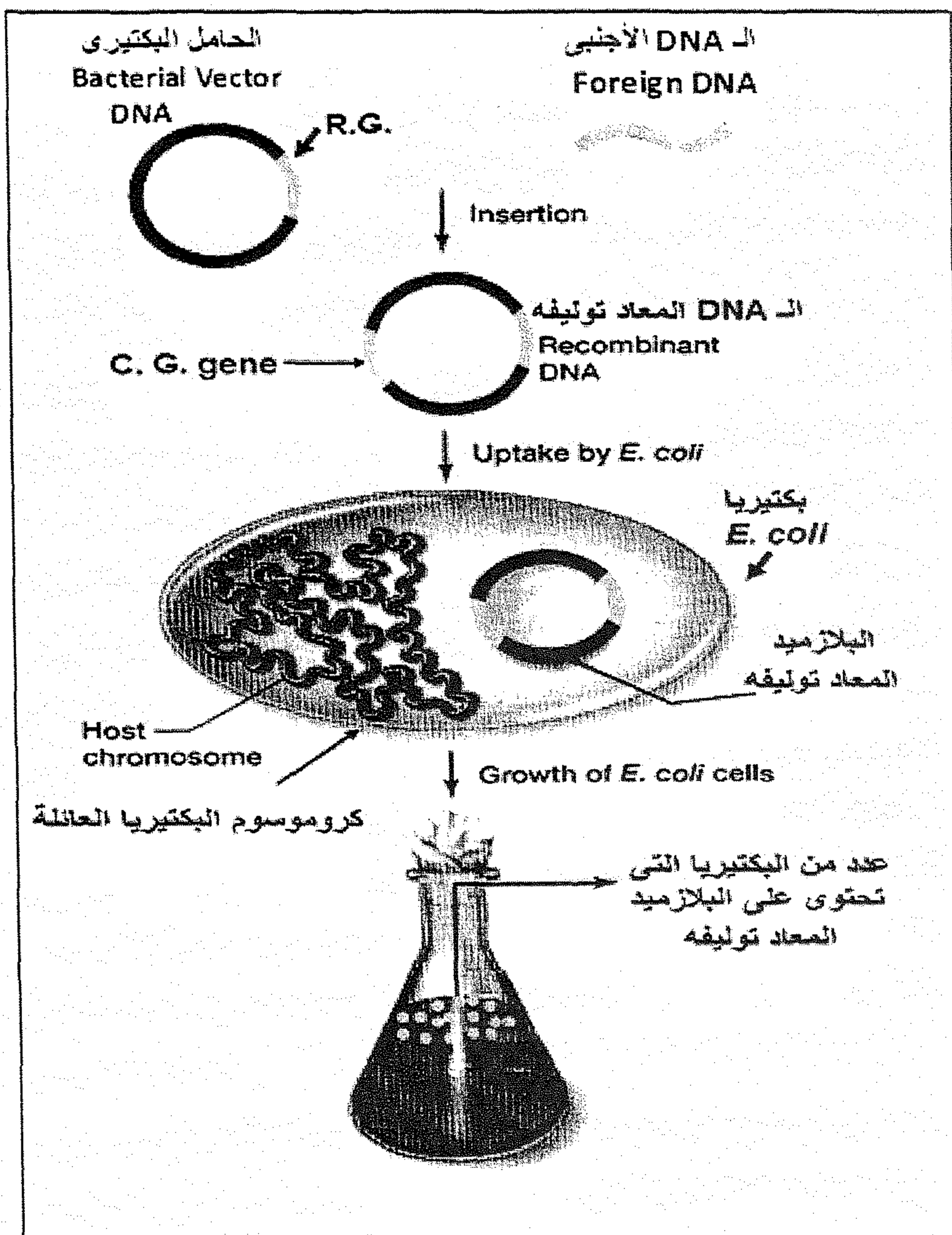
١- العناصر اللازمة لتضاعفه وتكاثره داخل الخلية البكتيرية العائله.

٢- الجين المكلون (C.G.) أو الـDNA الأجنبى (Foreign DNA)

٣- الجين المخير (Reporter gene (R.G.) وهو جين المقاومة لأحد المضادات الحيوية البكتيرية.

وتسمى السلالة البكتيرية التى تحتوى على الجين المكلون (C.G.) والذى يظهر تعبيره الجينى داخل الخلية البكتيرية العائله باسم الكلون (Clone) وهذه السلالة البكتيرية التى تحتوى على الجين الأجنبى أو الجين المكلون الذى مصدره كائنات حقيقية النواة لا تتواجد فى الطبيعة والخطوات المتبعة فى الحصول على مثل هذه الكلون البكتيرية (Bacterial clone) هى (شكل ٨٥):

- ١- الحصول على الجين المراد كلونته (C.G.) أو الـ DNA الأجنبى
- ٢- استخلاص البلازميد البكتيرى الذى يستخدم كحامل (Vector) فى نقل وإدخال الجين المكلون إلى البكتيريا العائلة الذى يحتوى على الجين المخبر (R.G) وهو جين المقاومة لأحد المضادات الحيوية.
- ٣- كسر هذا البلازميد البكتيرى عند منطقة واحدة باستخدام أحد إنزيمات الكسر المحدد (R. E.).
- ٤- ربط أو وصل (Joining) الجين المكلون (C.G.) بالبلازميد البكتيرى باستخدام الطرق المتبعة فى ذلك والتي سبق شرحها للحصول على بلازميد معاد توليفه (R.P.) يحتوى على الجين المكلون أو الـ DNA الأجنبى.
- ٥- يتم ادخال هذا البلازميد المعاد توليفه (R.P.) فى الخلايا البكتيرية النامية على بيئة غذائية وهذه الخلايا البكتيرية يجب أن تكون حساسه للمضاد الحيوى البكتيرى. ويساعد فى ادخال البلازميد والمعاد توليفه فى الخلايا البكتيرية النامية والحساسه للمضاد الحيوى وجود كلوريد الكالسيوم فى البيئة الغذائية.
- ٦- يسمح للخلايا البكتيرية بالنمو على هذه البيئة الغذائية لفترة من الزمن لتكوين مستعمرات بكتيرية.
- ٧- يضاف المضاد الحيوى البكتيرى إلى هذه البيئة الغذائية ويؤدى ذلك إلى قتل جميع الخلايا البكتيرية التى لم تحصل على البلازميد المعاد توليفه (R.P.) بينما تبقى وتستمر فى النمو الخلايا التى حصلت على البلازميد المعاد توليفه وما يحمله من الجين المكلون (C.G.).
- ٨- إنتخاب السلالة البكتيرية التى تحتوى على الجين المكلون ومثل هذه الكلون (Clone) لا تتواجد فى الطبيعة. وإذا ظهر التعبير الجينى للجين المكلون فى الخلايا البكتيرية فسوف تنتج كميات كبيرة من ناتج هذا الجين.



شكل (٨٥): يوضح خطوات كلونة (Cloning) البكتيريا *E. coli* بالـ DNA الأجنبى بإعادة توليف الحامل البكتيرى (Bacterial Vector) وتكوين الـ DNA المعاد توليفه بالجين أو الـ DNA الأجنبى ودخوله الخلية البكتيرية والتي تنمو وتتقسم مكونة عديد من الخلايا البكتيرية المكلونة بالـ DNA الأجنبى. وإذا حدث تعبير جيني للـ DNA الأجنبى داخل الخلايا البكتيرية سوف تنتج كميات كبيرة من ناتج هذا الجين الأجنبى.

ولقد استخدمت البكتيريا المهندسة جينياً ببعض جينات الكائنات حقيقية النواة فى إنتاج بعض الهرمونات والبروتينات الهامة مثل هرمون الانسولين (Insulin) الإنسانى وهرمون النمو السوماتوستاتين (Somatostatin) وكذلك هرمون النمو الإنسانى السوماتوتروبين (Somatotropin) بطريقة اقتصادية ، ومع ذلك توجد بعض العقبات التى تواجه التعبير الجينى للجينات المكونة فى البكتيريا (*E. coli*) وخاصة عندما يكون مصدر هذه الجينات كائنات حقيقية النواة (Eukaryotes) ومن بين هذه العقبات التى أمكن التغلب عليها ما يلى:

ربما لا تستطيع البكتيريا المكونة بالجين الأجنبى نسخ هذا الجين الأجنبى لصعوبة تعرف إنزيم بلمرة الـ RNA البكتيرى (RNA polymerase) على الجين الأجنبى ونسخه ولقد أمكن التغلب على هذه العقبة بوضع بروموتور بكتيرى لأحد الجينات البكتيرية بجوار الجين المكون وبالتالي يستطيع إنزيم البلمرة البكتيرى من التعرف على هذا البروموتور البكتيرى ونسخ الجين المكون (C.G.).

ربما يتم نسخ الجين المكون وتكوين الـ hnRNA ولكن البكتيريا المكونة لا تستطيع ترجمته إلى البروتين المناسب وذلك لاحتوائه على الانترونات (Introns) بالإضافة إلى الاكزونات (Exons) التى تترجم لأن البكتيريا المكونة لا تحتوى على الإنزيمات اللازمة لإزالة الانترونات وتجميع الاكزونات معاً وتكوين جزئى الـ mRNA الناضج والذى يتم ترجمته إلى البروتين المناسب. وللتغلب على هذه العقبة يجب تجهيز الجين المكون (C.G.) بالصورة التى تجعله خالياً من الانترونات وذلك عن طريق استخدام النسخ العكسى لجزئيات الـ mRNA الناضجة أو الخالية من الانترونات بواسطة إنزيم النسخ العكسى وتخليق خيط مفرد من الـ DNA يعرف باسم الـ cDNA والذى يستخدم فى تخليق الجين المكون والخالى من الانترونات.

١. ربما يتم نسخ الجين المكون وتكوين الـ mRNA الناضج ويتم ترجمته إلى البروتين المناسب ولكن تقوم إنزيمات تكسير البروتين (Proteases) البكتيرية بتكسيده إلى وحداته البنائية من الأحماض الأمينية قبل فصله وعزله وتنقيته من البكتيريا المكونة. وللتغلب على هذه العقبة يمكن استخلاص وتنقية البروتين الناتج من البكتيريا المكونة بصورة سريعة قبل تكسيده وعموماً يجب تجهيز الجين المكون قبل كلونته فى البكتيريا بالصورة التى تسمح بنسخه وترجمته بواسطة الريبوسومات البكتيرية إلى البروتين المناسب وكذلك استخلاصه وتنقيته من البكتيريا المكونة بالكميات المناسبة. ولقد

استخدمت البكتيريا المكلونة وخاصة بكتيريا القولون (*E. coli*) كمصانع بيولوجية لإنتاج بعض هرمونات الإنسان وكذلك بعض البروتينات الهامة والتي من بينها ما يلي:

أولاً: البكتيريا المكلونة بجين هرمون السوماتوستاتين

Bacterial Clone with Somatostatin Gene

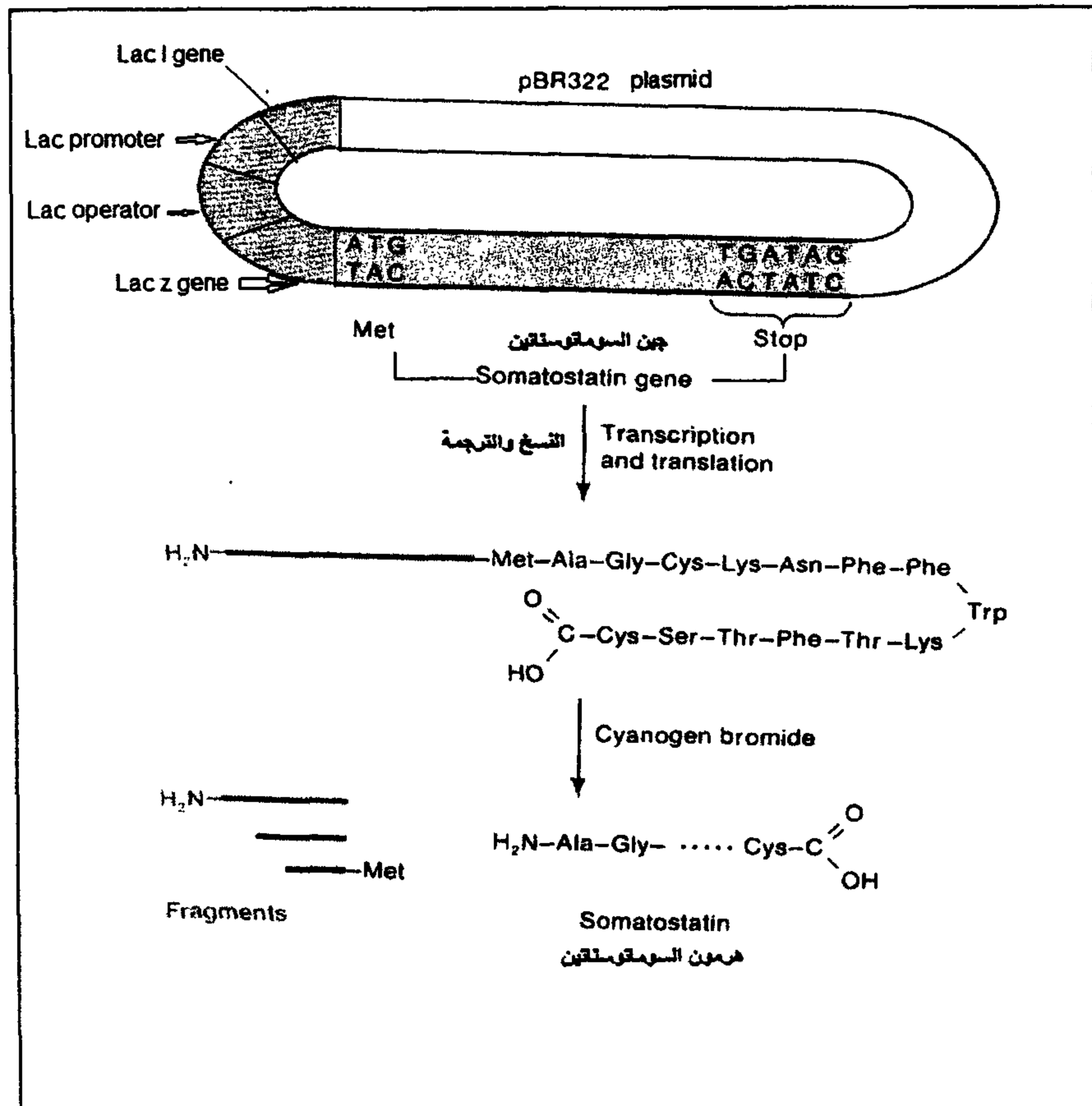
يعتبر هرمون السوماتوستاتين من أهم الهرمونات في الإنسان حيث يعمل من خلال ارتباطه بهرمون السوماتوتروبين على تنظيم عملية النمو في الإنسان . ونظراً لأهمية هذا الهرمون في علاج بعض حالات اضطراب النمو في الإنسان تم استخدام بكتيريا القولون المكلونة بجين إنتاج هذا الهرمون لإنتاجه بطريقة اقتصادية على النحو التالي:

١- تخليق الجين الذي ينتج هذا الهرمون صناعياً باستخدام الطرق الكيميائية ومن حسن الحظ أن هذه الهرمون يتكون من بروتين يحتوي على عدد قليل من الأحماض الأمينية عددها ١٤ حامض أميني مما يسهل من التخليق الكيميائي لهذا الجين والذي يجب أن يحتوي على ٤٢ زوج من النيوكليوتيدات (١٤×٣) بترتيب معين ومحدد والتي تمثل الشفرات اللازمة لتتابع الأربعة عشر حامض أميني في هذا البروتين. ويضاف لهذا الجين المخلوق صناعياً شفرة بداية الترجمة (TAC) كما يضاف إليه في نهايته شفرتين من شفرات إنهاء الترجمة ACTATC (شكل ٨٦) وعلى ذلك سوف يبدأ mRNA الناتج من نسخ هذا الجين بشفرة بداية الترجمة AUG والخاصة بالحامض الأميني الميثيونين وينتهي بشفرتي نهاية الترجمة UGAUGA وبينهما الشفرات اللازمة للتعبير عن الأحماض الأمينية الأربعة عشر التي يتكون منها هرمون السوماتوستاتين.

٢- الحامل (Vector) المستخدم في حمل هذا الجين هو البلازميد pBR322 المعاد توليفه حيث يحتوي على كل من بروجين (Promoter) وأوبريتور (Operator) والجين المنظم LacI لاوبرون اللاكتوز (Lac operon) وجزء من الجين Lac z الذي يحمل شفرات بعض الأحماض الأمينية بالطرف الذي يحتوي على مجموعة الأمينو من إنزيم β -galactosidase (شكل ٨٦).

٣- يتم ادخال جين السوماتوستاتين في هذا البلازميد المعاد توليفه السابق باستخدام أحد إنزيمات القطع المحدد (R.E.) والتي تسبب كسر في الجين Lac z مكوناً أطراف عمياء وبالتالي يحدث ربط أو

وصل جين السوماتوتروبين المخلق صناعياً ذو الأطراف العمياء فى نهاية الجين Lac z ويصبح هذا البلازميد المعاد توليفه محتوياً على جين السوماتوستاتين بالإضافة إلى كل من بروموتور واوبريتور وجزء من الجين Lac z لاوبرون اللاكتوز (Lactose operon).



شكل (٨٦): يوضح البلازميد pB322 المعاد توليفه بجين هرمون السوماتوستاتين وكل من الجين LacI وبروموتور واوبريتور وكذلك جزء من الجين Lac z لاوبرون اللاكتوز. وعند كلونة البكتيريا *E. coli* بهذا البلازميد المعاد توليفه تقوم بإنتاج هرمون السوماتوستاتين والمرتببط ببعض الأحماض الأمينية لإنزيم الـ β -galactosidase والتي يمكن فصلها عن الهرمون بالمعاملة بمركب بروميد السيانوجين (Cyanogen bromide) وبذلك نحصل على هرمون السوماتوستاتين النقي.

٤- ادخال هذا البلازميد المعاد توليفه السابق فى البكتيريا *E. coli* والحصول على سلالة بكتيرية مكلونة بهذا البلازميد المعاد توليفه والذى يحتوى على جين هرمون السوماتوستاتين. وهذه السلالة البكتيرية المكلونة (Bacterial clone) تقوم بإنتاج هرمون السوماتوستاتين ليس ذلك فقط ولكنها تقوم بإنتاج هذا الهرمون تحت النظام التحفيزى.

٥- عند إضافة المحفز إلى البيئة الغذائية التى تحتوى على البكتيريا المكلونة السابقة يحدث تحفيز لاوبرون اللاكتوز (Lac operon) وتنتج البروتين الذى يتركب من هرمون السوماتوتروبين مرتبط ببعض الأحماض الأمينية لإنزيم β -galactosidase.

٦- تنقية هذا البروتين الناتج من البكتيريا المكلونة السابقة ثم يجرى فصل وتنقية هرمون السوماتوستاتين بإضافة مركب بروميد السيانوجين (Cyanogen bromide) والذى يقوم بفصل هرمون السوماتوستاتين عن الأحماض الأمينية لإنزيم β -galactosidase وبذلك نحصل على هذا الهرمون فى صورة نقية.

ثانياً: البكتيريا المكلونة بجين هرمون السوماتوتروبين

Bacterial Clone with Somatotropin Gene

يعمل هذا الهرمون مع هرمون السوماتوستاتين على تنظيم عملية النمو فى الإنسان ويستعمل هذا الهرمون فى علاج بعض أمراض اضطراب النمو فى الإنسان وخاصة التقزم. ويتركب هذا الهرمون من بروتين يحتوى على ١٩١ حامض أمينى بترتيب محدد وبالتالي فإن الجين الذى ينسخ ويترجم إلى هذا البروتين يحتوى على تتابع نيوكليوتيدى محدد من ٥٧٣ نيوكليوتيده (٣ × ١٩١) تمثل الشفرات اللازمة لكل الأحماض الأمينية التى يتركب منها هذا البروتين. ولقد تم تخليق الجين الذى ينتج هذا البروتين صناعياً باستخدام الطرق الكيميائية ثم كلونته (Cloning) بعد ذلك فى بكتيريا القولون *E. coli* للحصول على بكتيريا مكلونة بهذا الجين باتباع نفس الخطوات السابقة فى كلونة البكتيريا بجين إنتاج هرمون السوماتوستاتين حيث أمكن الحصول على سلالة بكتيرية مكلونه بهذا الجين الذى ينتج هرمون السوماتوتروبين تحت النظام

التحفيزى بادخال هذا الجين فى اوبرون اللاكتوز كما هو الحال فى البكتيريا المكلونه بجين هرمون السوماتوستاتين عن طريق البلازميد pBR322 المعاد توليفه بهذا الجين وكل من بروموتور واوبريتور والجين Lac I وجزء من الجين z لاوبرون اللاكتوز.

ثالثاً: البكتيريا المكلونه بجين هرمون الأنسولين

Bacterial Clone with Insulin Gene

يرجع مرض السكر إلى انخفاض تركيز هرمون الأنسولين (Insulin) فى الدم. وهذا الهرمون تنتجه الخلايا بيتا (β -cells) الموجودة فى البنكرياس ونظراً لأن هذا الهرمون يقوم بتنظيم تركيز سكر الجلوكوز (Glucose) فى الدم فإن انخفاض تركيز هذا الهرمون فى الدم يؤدي إلى ارتفاع تركيز سكر الجلوكوز فى الدم بدرجة قد تؤدي إلى الوفاة. وعادة ما يعالج المرضى بحقنهم بجرعات من هرمون الأنسولين المحضر من بنكرياس الخنازير أو الحيوانات المذبوحة، وعلى الرغم من فعالية هذا الهرمون إلا أنه بسبب الحصول عليه من حيوانات مختلفة فقد يسبب بعض الأعراض الجانبية غير المرغوبة كما أن عملية عزله وتنقيته من البنكرياس يعترها كثير من التعقيد إلى جانب تكلفتها المرتفعة.

ونظراً لأن الأنسولين البشرى يكون أفضل من الأنسولين المستخلص من الحيوانات الأخرى فى علاج مرض السكر إلا أن عدم إمكانية الحصول عليه من الإنسان دفعت الباحثين فى مجال هندسة الجينات أو الهندسة الوراثية إلى استخدام بكتيريا القولون *E. coli* المكلونه بجين إنتاج هذا الهرمون فى إنتاجه بطريقة اقتصادية وبكميات كبيرة يمكن استخدامها فى الأغراض العلاجية. وينتج هرمون الأنسولين فى خلايا البنكرياس على صورة جزيء بريبروانسولين (Preproinsulin) يحتوى على أربعة أنواع من السلاسل عديدة الببتيد على النحو التالى (شكل ٨٧) :

1- N-terminal signal sequence

وهي سلسلة عديدة الببتيد تحتوي على ١٦ حامض أميني بتتابع محدد.

2- C-peptide

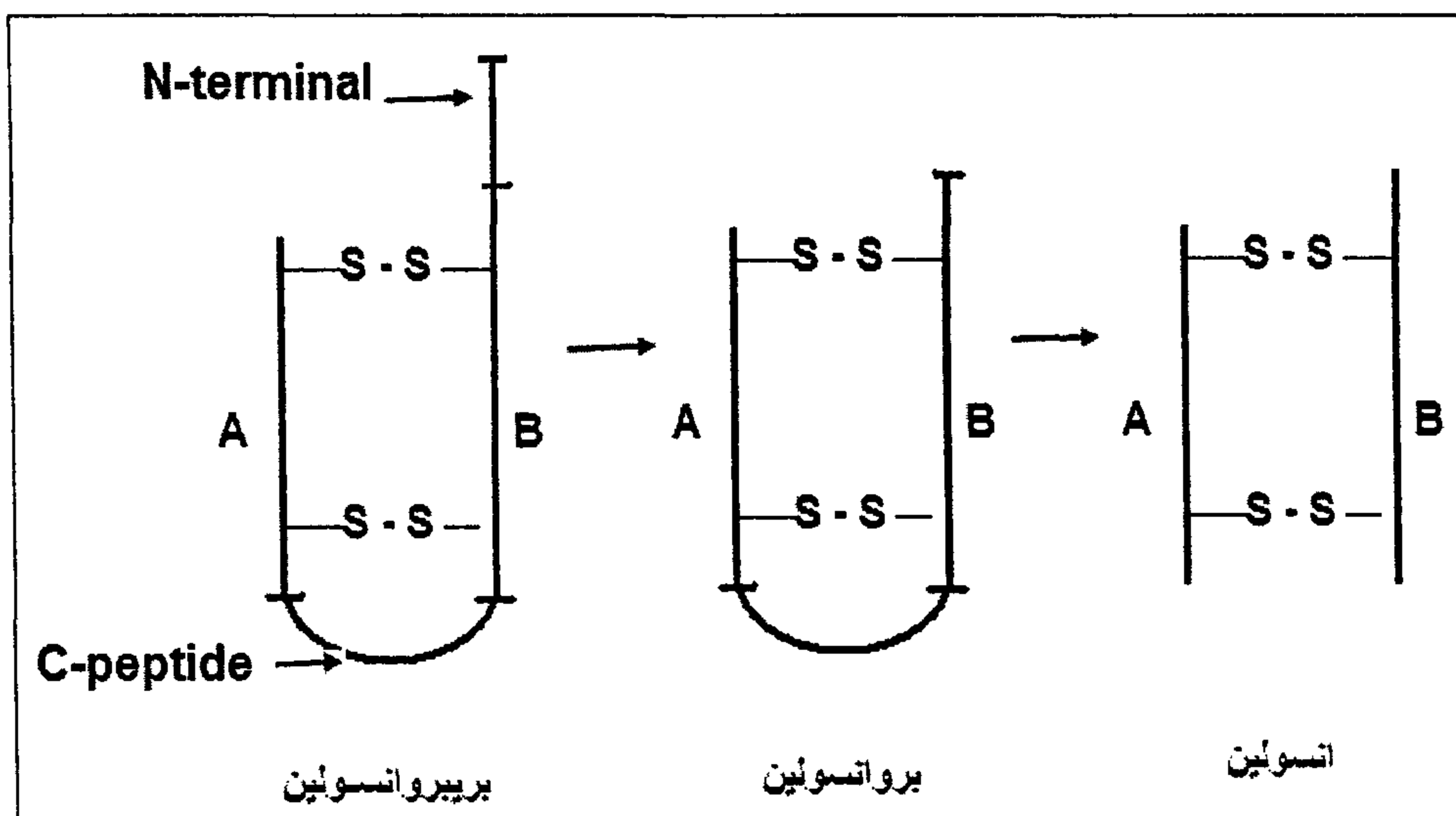
وهي سلسلة عديدة الببتيد تحتوي على ٣٣ حامض أميني بتتابع محدد أيضاً.

3- A-chain

وهي سلسلة عديدة الببتيد تحتوي على ٢١ حامض أميني بتتابع محدد كذلك.

4- B-chain

وهي سلسلة عديدة الببتيد تحتوي على ٣٠ حامض أميني بتتابع محدد.



شكل (٨٧): يوضح إنتاج هرمون الأنسولين بواسطة خلايا البنكرياس في صورة جزيء بريبروانسولين (Preproinsulin) وتحويله إلى جزيء بروانسولين أولي (Proinsulin) ثم تحول الأخير إلى جزيء الأنسولين الفعال وظيفياً الذي يحتوي على كل من السلسلة عديدة الببتيد A و السلسلة عديدة الببتيد B فقط.

وتحدث تحورات لهذا الجزيء (بريبروأنسولين) تتمثل فى إزالة السلسلة عديدة الببتيد N-terminal signal وبذلك يتحول هذا الجزيء الأولى إلى جزيء بروأنسولين (Proinsulin) وإلى ذلك إزالة السلسلة عديدة الببتيد C-peptide وبذلك يتحول جزيئى البروانسولين (Proinsulin) إلى جزيء الأنسولين (Insulin) الفعال وظيفياً والذي يتركب فقط من كل من السلسلة عديدة الببتيد A والسلسلة عديدة الببتيد B (شكل ٨٧) وعلى ذلك تستخدم سلالتين بكتيريتين لإنتاج هرمون الأنسولين أحدهما يجب كلونتها بالجين A الذى ينتج السلسلة عديدة الببتيد A والسلالة الأخرى مكلونه بالجين B الذى ينتج السلسلة عديدة الببتيد B فقط بإتباع الخطوات التالية (شكل ٨٨):

١- تخليق الجين A صناعياً الذى يحتوى على التتابع النيوكليوتيدى الذى يحمل الشفرات اللازمة للتعبير عن الأحماض الأمينية الإحدى وعشرون حامض أمينى التى تدخل فى تركيب السلسلة عديدة الببتيد A أى تخليق الجين الذى يحتوى على التتابع النيوكليوتيدى المحدد المكون من ٦٣ زوج (٢١×٣) من النيوكليوتيدات باستخدام الطرق الكيميائية.

٢- تخليق الجين B صناعياً الذى يحتوى على تتابع نيوكليوتيدى محدد مكون من ٩٠ زوج من النيوكليوتيدات (٣٠×٣) والذي يحمل الشفرات اللازمة للتعبير عن الأحماض الأمينية الثلاثين والتى تدخل فى تركيب السلسلة عديدة الببتيد B.

٣- كلونة كل من الجين A والجين B المخلقان صناعياً ببلازميد بكتيرى معاد توليفه (R.P.) يحتوى على الجين A أو الجين B بجانب إحتوائه على الجين المخبر Reporter gene (R.G.) وهو جين المقاومة لأحد المضادات الحيوية البكتيرية وذلك لإنتخاب البكتيريا المكلونة بأى من الجينين A أو B.

٤- ومن الناحية العملية يتم تصميم البلازميد البكتيرى المعاد توليفه الذى يحتوى على الجين A أو الجين B بحيث يحتوى على بروجينوتور واوبريتور وجزء من الجين Z لاوبرون اللاكتوز (La operon) ويتم إدخال الجين A أو الجين B بين موقع الاوبريتور Operator (O) والجين Z الذى ينتج إنزيم الـ β -galactosidase وكذلك جين المقاومة للمضاد الحيوى الامبيسلين (AmpR).

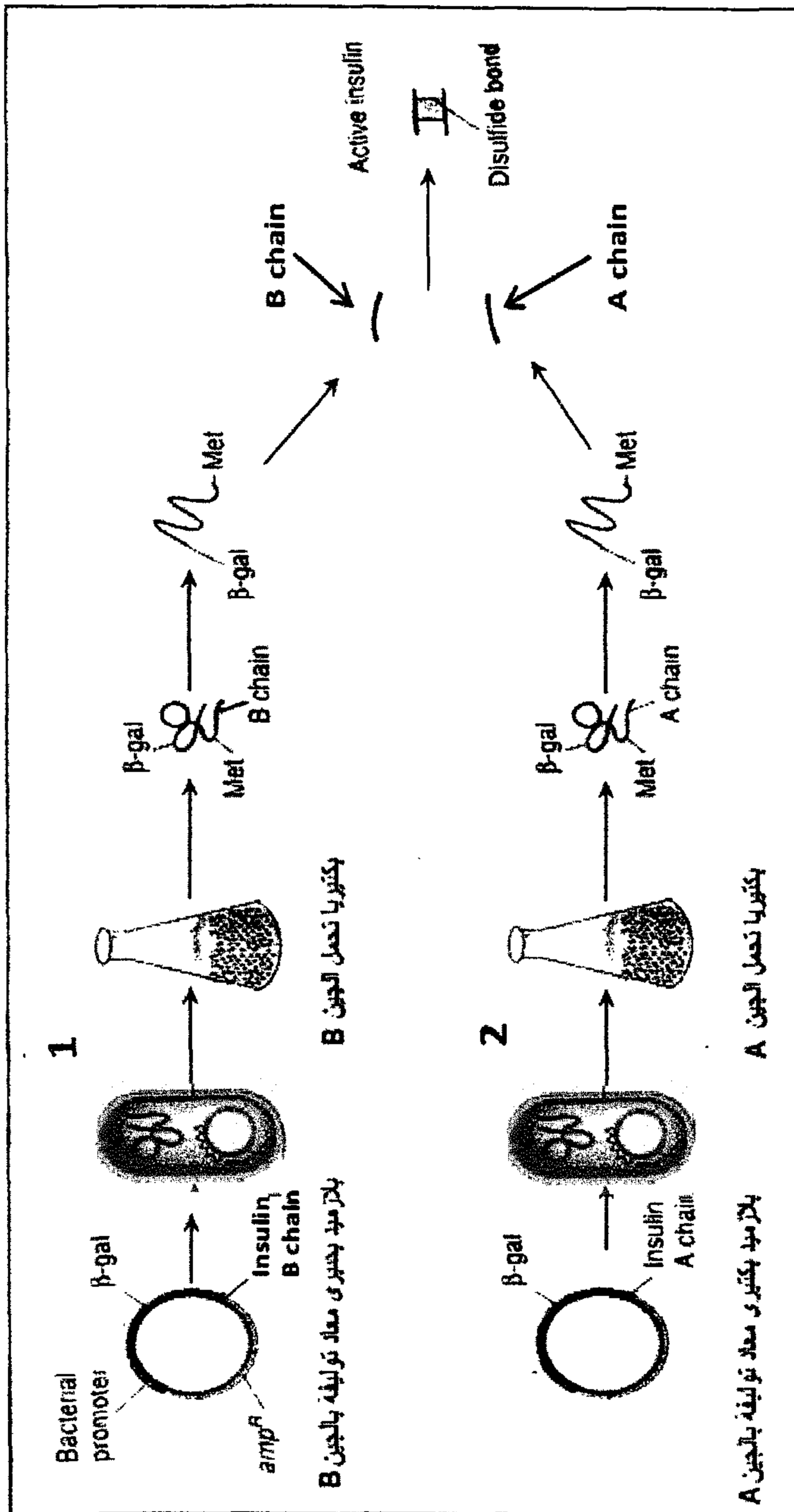
٥- إنتخاب البكتيريا المكلونة بأى من الجين A أو الجين B بإضافة المضاد الحيوى الامبيسلين إلى المزرعة البكتيرية.

٦- تقوم البكتيريا المكلونة بهذا البلازميد المعاد توليفه بالصورة السابقة والذي يحمل الجين A فى إنتاج السلسلة عديدة الببتيد A بينما تقوم السلالة الأخرى المكلونة بالبلازميد المعاد توليفه والذي يحمل الجين B فى إنتاج السلسلة عديدة الببتيد B تحت النظام التحفيزى.

٧- تنقية واستخلاص كلاً من السلاسل عديدة الببتيد A وكذلك السلاسل عديدة الببتيد B من كلا السلالتين البكتيريتين المكلونتين بأى من الجينين A أو B.

٨- خلط كلاً من النوعين من السلاسل عديدة الببتيد A و B معاً لتكوين هرمون الأنسولين الفعال وظيفياً.

ولقد خضع هذا الهرمون البشرى والمنتج بواسطة بكتيريا القولون المكلونة بجينات إنتاج هرمون الأنسولين لاختبارات عديدة من أجل التأكد من سلامة استعماله وبدأ تسويقه تجارياً فى عدد من البلدان مما جعله واحداً من أهم تطبيقات هندسة الجينات فى البكتيريا التى أخذت طريقها إلى حيز التنفيذ.



شكل (٨٨) : يوضح خطوات إنتاج هرمون الأنسولين بواسطة البكتيريا *E-coli*:

١- كلونة البكتيريا بالبلازميد المعاد توليفه بجين إنتاج للسلسلة عديدة الببتيد B.

٢- كلونة البكتيريا بالبلازميد المعاد توليفه بجين إنتاج للسلسلة عديدة الببتيد A.

حيث تقوم كلا السلالتين البكتيريتين بإنتاج كل من السلاسل عديدة الببتيد A و B بصورة مستقلة ثم تنقيتها وخطهما معاً للحصول على هرمون الأنسولين الفعال وظيفياً.

الباب الحادى عشر

العلاج الجيني Gene Therapy

العلاج الجيني هو أحد تطبيقات تكنولوجيا الـ DNA المعاد توليفه المبتكرة والذي يقدم عديد من الوسائل واسعة الانتشار لعلاج العديد من الأمراض الوراثية.

ومن الناحية التاريخية أنه في سبتمبر عام ١٩٩٠ كانت الطفلتين أشاني Ashani وسينثيا Cynthia أول حالة من حالات العلاج الجيني في علاج مرض وراثي. فقد ورثت كل طفلة منهما الجين الطافر الذي يسبب نقص المناعة الخطير والذي يجعلهم غير قادرين على مقاومة العدوى الممرضة. وكان علاجهم الجيني بإمداد أي منهما ببلاين من الخلايا التي تحمل الجين الطبيعي والذي يوجه إنتاج البروتين الطبيعي والذي يعوض وجود البروتين الطافر غير الفعال وظيفياً والمنتج بواسطة الخلايا المريضة.

ويتضح من ذلك جلياً أن الفكرة الأساسية للعلاج الجيني تبدو سهلة جداً والتي تتمثل في إدخال الجين الطبيعي في الخلايا التي تحمل الجين الطافر. ومن الناحية النظرية أنه عندما يكون المرض الوراثي سببه جين مفرد طافر فإن علاجه يكون بطريقة مباشرة بالمعاملة بالجين الطبيعي عن طريق إدخال الجين الطبيعي والذي يقوم بصناعة البروتين الطبيعي الفعال وظيفياً والذي يقوم بالوظيفة المناسبة في الخلايا المريضة.

والمقدرة على وضع الخطة الناجحة للعلاج الجيني تعتمد على معرفة كينونة وطبيعة الجين الطافر والذي يسبب المرض كما تتطلب معرفة العلماء المعرفة الكاملة حول نظم التعبير الجيني والخطوات البيوكيميائية التي تحدث في كل من الخلايا السليمة والخلايا المريضة وذلك

لتصميم ووضع الطريقة المثلى للعلاج الجيني بما فيها الطريقة المثلى لتوصيل الجين العلاجي الطبيعي إلى الخلايا الهدف من جسم الإنسان.

وعلى الرغم من نجاح العلاج الجيني الأولى في علاج كل من الطفلتين أشاني Ashani وسينثيا Cynthia إلا أنه ظهرت كثير من نقاط الجدل حول العلاج الجيني في التسعينات من القرن العشرين والتي مازالت مستمرة حتى الآن حيث مازال يواجه كثير من الاعتراضات قبل أن يصبح علاج واسع الانتشار لعلاج بعض الأمراض الوراثية ومع ذلك استخدمت طرق العلاج الجيني الخاصة كعلاج ناجح لبعض الأمراض الوراثية المعينة حيث أن بعض حالات العلاج الجيني تم إجراؤها على حالات مرضية في الإنسان.

ومن بين أهم الاعتراضات التي تواجه استخدام العلاج الجيني هو الحاجة إلى وجود آلية آمنة لتوصيل الجين العلاجي. وهذه الآلية تتضمن وجود حامل (Vector) للجين العلاجي والذي يقوم بكل دقة بتوصيل الجين إلى الخلايا الهدف في جسم الأفراد المرضى. والحاملات (Vectors) المستخدمة في العلاج الجيني هي عبارة عن جزيئات من الـ DNA الفعالة في توصيل الجين العلاجي إلى الخلايا المريضة من جسم الإنسان. ولقد اشتقت هذه الحاملات من عديد من المصادر منها الـ DNA لجينوم الرتروفيروسات (Retroviruses) والأدينوفيروسات (Adenoviruses) وكذلك البلازميدات (Plasmids) البكتيرية من الـ DNA الدائرية ومزدوجة الخيط وكذلك كروموسومات الكائنات حقيقية النواة المصنعة معملياً.

ويوجد طريقتين رئيسيتين للعلاج الجيني والتي تعتمد على ما إذا كانت الخلايا المريضة تعالج داخل جسم المريض (In vivo) وفيها يجب استخدام طرق توصيل الجين العلاجي والتي توجه بكل دقة الجين العلاجي إلى خلايا خاصة من جسم المريض. أما إذا كان العلاج الجيني خارج جسم المريض (Ex vivo) فإنه يجب عزل وإزالة الخلايا المريضة من المرضى وإدخال الجين العلاجي بها في المعمل ثم إعادة هذه الخلايا التي تحتوي على الجين العلاجي إلى داخل جسم نفس المريض.

General Principles of Gene Therapy**الأساسيات العامة للعلاج بالجينات**

تعتمد معظم الطرق المباشرة للعلاج الجينى على اصلاح الفشل الوراثى الذى يسببه جين مفرد (Single gene) عندما تكون نسختى (Two copies) الجين غير فعالتين وظيفياً وذلك بالنسبة للأمراض الوراثية المتحثة. فإحلال نسخة جديدة وسليمة من الجين يمكنها أن تعالج هذا الفشل الوراثى وهذا ما يعرف أحياناً بالعلاج الجينى بالإحلال (Replacement gene therapy) والذى غالباً ما يشمل الأمراض الوراثية التى غالباً ما تؤثر على عضو (Organ) واحد من الجسم أو قليل من أعضاء الجسم والخطوات الأساسية للعلاج الجينى بالإحلال هى:

١- تحديد وتعيين وتوصيف الجين وهى أول خطوة فى العلاج الجينى بالإحلال حيث يجب تحديد وتعيين الجين المسئول عن الفشل الوراثى.

٢- اختيار الحامل (Vector) المناسب للجين . فمن الناحية العملية فإن معظم الحاملات التى تستخدم فى توصيل الجين إلى المرضى تتم باستخدام بلازميدات بكتيرية كحاملات للجين السليم وقد يستخدم أحياناً العلاج الجينى بطريقة مباشرة باستخدام قطعة من الـ DNA تحمل الجين العلاجى (Therapeutic gene) وهى أكثر طرق التوصيل الخاصة المستخدمة فى العلاج الجينى. وتستخدم فى معظم الحالات الأخرى الفيروسات المتحورة كحامل للجين العلاجى. ولكن نظراً لأن بعض الفيروسات تسبب بعض الأمراض لذلك يجب نزع أسلحتها بطريقة وراثية حتى لا تسبب أى مرض . ورغم ذلك فإن حوالى ٧٠% من محاولات العلاج الجينى فى الإنسان كانت تستخدم الفيروسات المحورة كحاملات (Vectors) للجين العلاجى ويستخدم لهذا الغرض مجموعتين رئيسيتين من الفيروسات هما: الادينوفيروسات (Adenoviruses) والرتروفيروسات (Retroviruses) .

٣- كلونة الجين العلاجى وذلك من خلال ربط (Joining) الجين العلاجى بالحامل المناسب بحيث يكون البناء المكون من الجين العلاجى أو الجين السليم والحامل مصمماً بطريقة تسمح بإظهار التعبير الجينى المناسب له بمجرد أن يتواجد فى خلايا المرضى.

٤- توصيل الجين العلاجى أو الجين السليم للمرضى ويتم ذلك بواسطة عديد من الطرق المتنوعة منها:

أ- حقن البناء المكون من الجين السليم والحامل فى مجرى الدم أو فى نسيج آخر.

ب- فى بعض الحالات تزال بعض الخلايا من المرضى ويجرى هندستها وراثياً بإدخال الجين السليم وذلك بتنمية هذه الخلايا فى مزارع خلوية ثم تعاد هذه الخلايا المهندسة وراثياً والتي تحتوى على الجين السليم مرة أخرى إلى المرضى وتعرف هذه الطريقة بالعلاج الجينى خارج الخلية (Ex vivo gene therapy) وذلك لأن هندسة الجينات وراثياً تتم خارج جسم المريض.

ج- فى بعض الحالات الأخرى يتم توصيل الجين السليم والحامل الذى يحمله بطريقة مباشرة إلى المريض عن طريق الحقن المباشر داخل الأنسجة عن طريق أداة قذف (Gene gun) أو بإدخاله فى الليبوسومات (Liposomes) وهذا ما يعرف بالعلاج الجينى داخل الخلية (In vivo gene therapy).

Gene therapy by gene patching

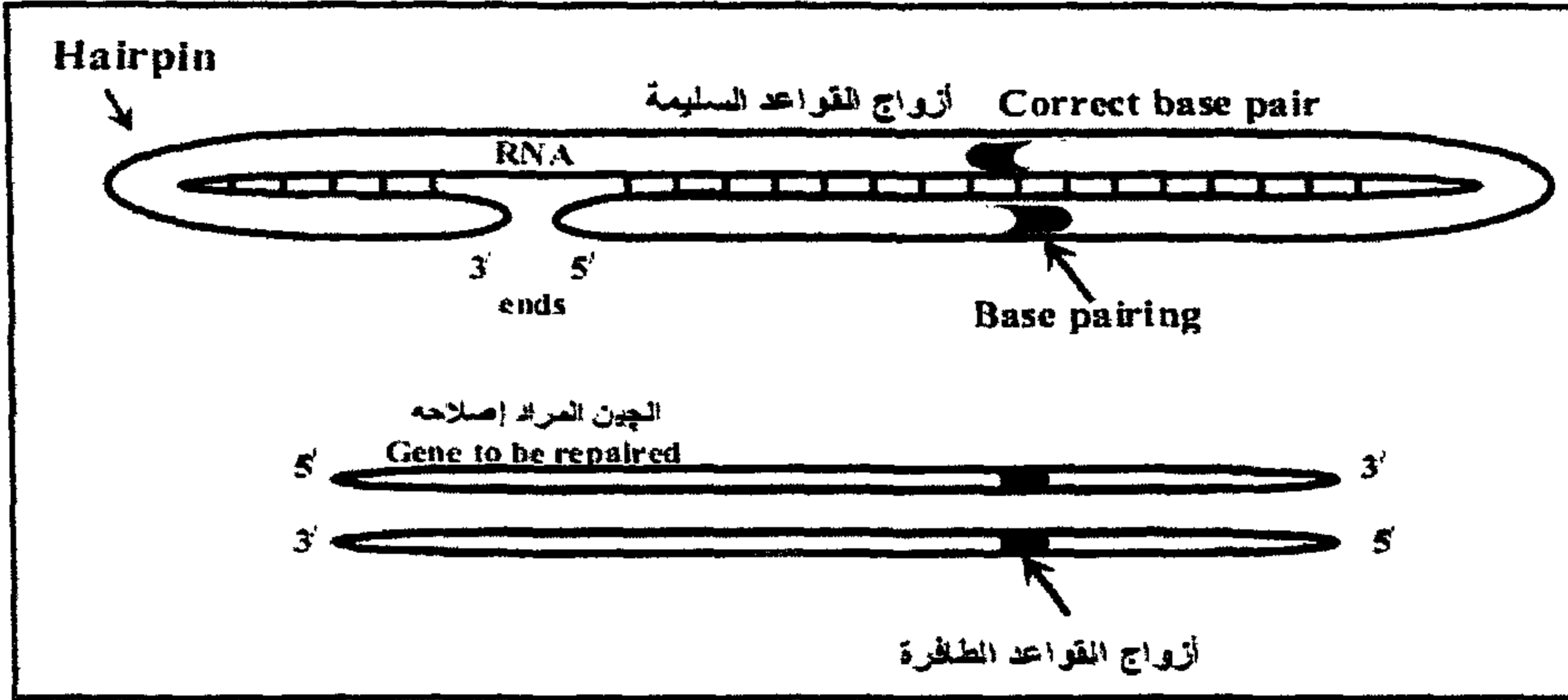
العلاج الجينى بإصلاح الجين

فى العلاج الجينى بالإحلال يكون عادة فى إحلال كل الجين غير الفعال وظيفياً بنسخه (Copy) كاملة من الجين الفعال وظيفياً (الجين السليم). ومع ذلك فإن بعض الجينات غير الفعالة وظيفياً يرجع إلى احتوائها على تغير فى نيوكليوتيده واحدة عن الجين الطبيعى والفعال وظيفياً، ففى مثل هذه الحالة فإنه يمكن اصلاح (Patched) هذا الجين بدلاً من إحلاله بجين فعال وظيفياً كاملاً. ويمكن أن يجرى هذا الإصلاح للجين عن طريق حدوث العبور (Crossing over) بين قطعة الجين صغيرة من الـ DNA عديدة النيوكليوتيدات السليمة بتلك النيوكليوتيدات المتغيرة أو المتحورة فى غير الفعال وظيفياً. ويجب أن تكون تلك القطعة الصغيرة من الـ DNA التى تستخدم فى الإحلال والتي تحتوى على النيوكليوتيدات السليمة طرفيها ملتويان (Hairpen) لحمايتهما ومنع تكسيرهما بواسطة إنزيمات (Exonucleases) ولكن هذه الطريقة مازالت فى مراحلها التجريبية (شكل ٨٩).

الادينو فيروسات كحاملات فى العلاج بالجينات

Adenovirus vectors in Gene Therapy

الادينو فيروس (Adenovirus) هو فيروس بسيط نسبياً مادته الوراثية عبارة عن جزيء مزدوج الخيط من الـ DNA فى صورة خطية أو طولية ويحتوى على حوالى ٣٦٠٠٠ زوج من النيوكليوتيدات وينتهى طرفى الـ DNA ببروتين طرفى لحماية طرفى الـ DNA ويهاجم هذا الفيروس خلايا الإنسان والفقاريات الأخرى.

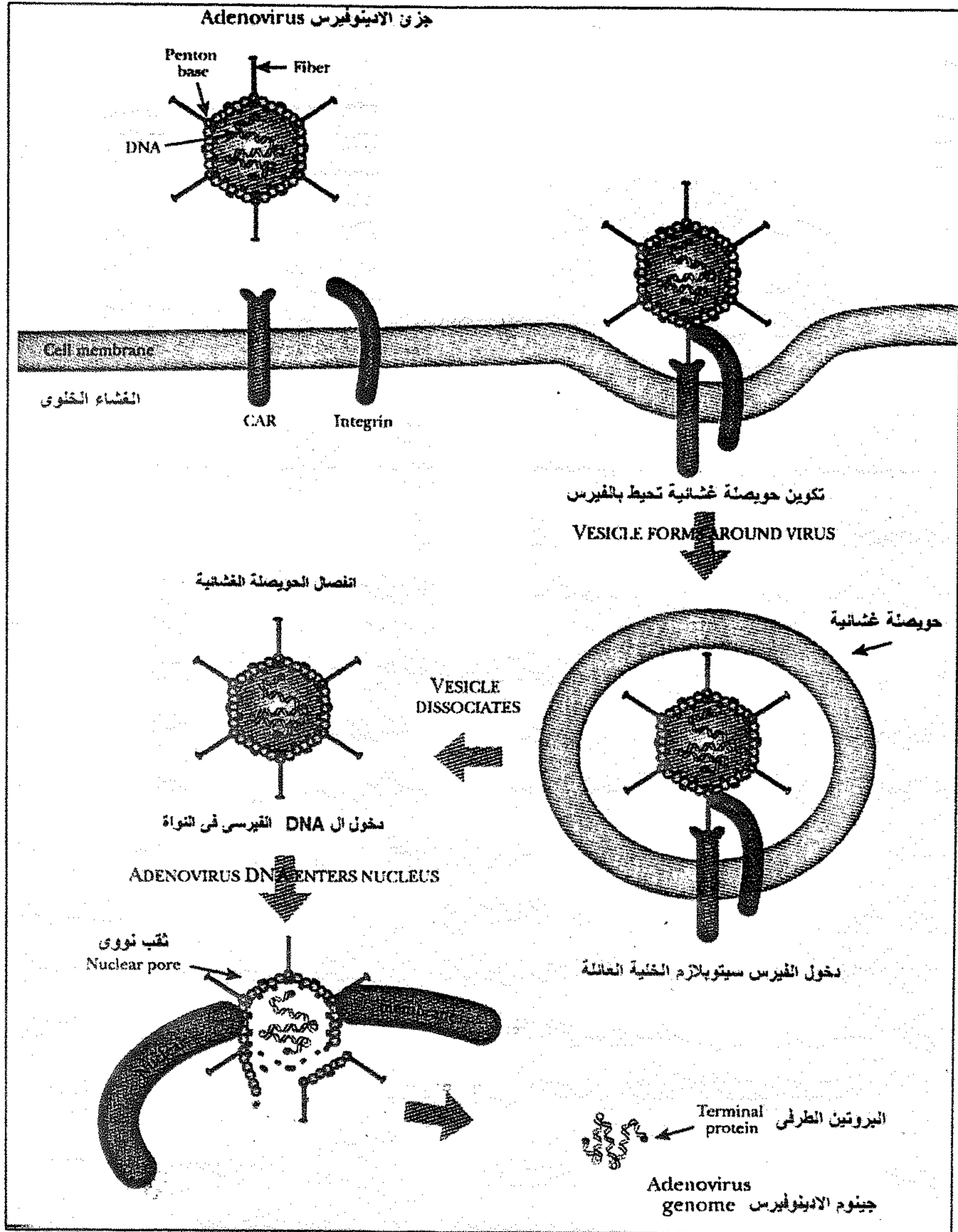


شكل (٨٩) : إصلاح الجين الطافر بإحلال النيوكليوتيدات السليمة أو الطبيعية محل تلك الطافرة أو المتغيرة بواسطة حدوث العبور (Crossing over) بين النيوكليوتيدات السليمة والطافرة فى الجين الطافر.

ويتركب الجزيء الفيروسي من غلاف بروتينى معقد التركيب يحتوى بداخله على جزيء الـ DNA المزدوج الخيط ، كما يحتوى الجزيء الفيروس على ألياف (Fibers) بروتينية والتي ترتبط بسطح الخلية العائلة عند مواقع استقبال خاصة على سطح الخلية العائلة حيث ترتبط قمة هذه الألياف عند مواقع الاستقبال فى الخلية العائلة (شكل ٩٠).

ويتم دخول جزيء الفيروس بالكامل إلى الخلايا العائلة عن طريق التعرف على كلاً من المستقبلين Integrin , CAR وبعد ذلك يحقن الفيروس مادته الوراثية (DNA) داخل النواة من خلال ثقب فى الغلاف النووى (شكل ٩٠). ولقد كانت الادينو فيروسات أول الفيروسات التى اختيرت كحاملات (Vectors) للاستخدام فى العلاج الجينى فى الإنسان وذلك للأسباب التالية:

- ١- أنها أقل ضرراً.
- ٢- أنها غير مسرطنة بمعنى أنها لا تسبب أوراماً سرطانية .
- ٣- من السهل تنميتها نسبياً ويمكنها أن تنتج كميات كبيرة من الفيروسات الجديدة.
- ٤- دورة حياتها (Life cycle) معروفة تماماً.
- ٥- وظيفة معظم جيناتها معروفة.
- ٦- التابع النيوكليوتيدى الكامل لها متاحاً ومعروفاً.



شكل (٩٠): خطوات دخول الفيروس (Adenovirus) الخلايا الحيوانية عن طريق التعرف على المستقبلين CAR والـ Integrin الموجودين على الغلاف الخلوى للخلية الحيوانية حيث يتم دخول الفيروس إلى الخلية عن طريق حويصلة غشائية تحيط بالفيروس والتي تتفصل عن الفيروس فى السيتوبلازم. ويقوم الفيروس بحقن الـ DNA الخاص به فى النواة من خلال ثقب فى الغلاف النووى.

والعدوى البسيطة بهذه الفيروسات تسبب بعض الالتهابات إلا أنها قد تسبب بعض الأمراض الخطيرة فى الأفراد التى نظامها المناعى مصاب أو ضعيف. وعلى ذلك عند تصميم هذه الفيروسات لاستخدامها كحاملات لجينات العلاج الجينى فإنه يجب نزع هذه الفيروسات من أسلحتها وذلك بشل نظام تضاعفها بإزالة الجين الذى ينتج بروتين (E1A) وهو البروتين الفيرس الذى يتكون فور حدوث العدوى بالفيرس وهذا البروتين يقوم بوظيفتين:

١- يعزز نسخ جينات الفيرس الأخرى.

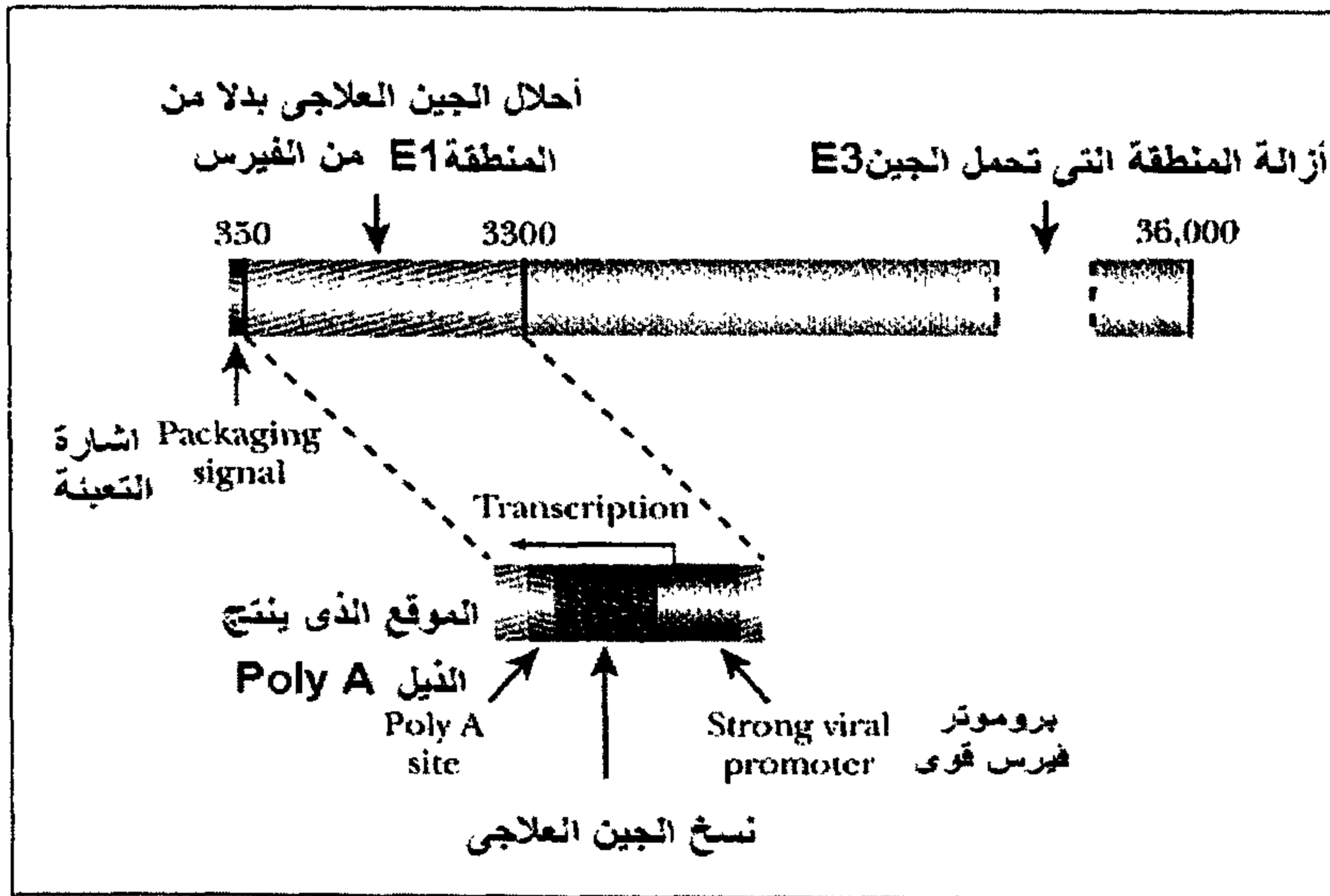
٢- أنه يرتبط ببروتين الخلية العائلة (Rb) والذى يمنع الخلية بصورة طبيعیه من الدخول فى مرحلة تضاعف الـ DNA (S-phase) وبالتالي يحت الخلية العائلة فى إظهار التعبير الجينى للجينات اللازمة لتخليق الـ DNA والتى يستخدمها الفيرس لتضاعفه الذاتى. ويتم الحصول على جزيئات الفيرس المشلولة معملياً بتنميتها على خلايا عائله معدلة جينياً تحتوى على الجين الفيرسى E1A مدموجاً فى الـ DNA للخلية العائلة. وجزيئات الفيرس الناتجة بواسطة هذه الطريقة لا يمكنها أن تتضاعف أو تتكاثر داخل الخلايا الحيوانية الطبيعية.

ويجب أن يكون طول جزيء الـ DNA فى الفيرس المعدل جينياً يماثل طول الطراز البرى (Wild-type) من هذا الفيرس حيث أنه إذا كان طول جزيء الـ DNA فى الفيرس المعدل جينياً أطول أو أقصر بمقدار ٥% من طول الـ DNA فى الطراز البرى تفشل عملية تكوين جزيئات الفيرس الكاملة الجديدة.

ونظراً لأن عملية ادخال الجين العلاجى فى الـ DNA الفيرس قد تجعله أطول من الطرز البرى عن طريق إحلاله بدلاً من الجينات التى تسبب شل تضاعف الفيرس فإنه تفشل عملية تكوين جزيئات فيرسية كاملة ولكن إزالة بعض الأجزاء من الـ DNA الفيرسية غير الضرورية قد تحل هذه المشكلة (شكل ٩١) وعلى الرغم من أن الجينات التى تحملها هذه الفيروسات المهندسة جينياً يحدث لها تعبير جينى بنجاح فى الأنسجة الحيوانية إلا أن هناك بعض المشاكل منها:

١. المشكلة الرئيسية هى أن العدوى الفيرسية تستمر لفترة قصيرة وعلى ذلك فإن التعبير الجينى للجينى يظهر لعدد قليل من الأسابيع فقط قبل أن يقوم النظام المناعى للكائن بإزالة الفيرس.

٢. أن المرضى الذين تكونت لديهم مناعة ضد الفيروس العلاجى فإن العدوى الثانية بنفس الفيروس المهندس جينياً سوف تفشل وعلى ذلك فإن استخدام هذه الفيروسات المعدلة جينياً كحاملات للجينات فى العلاج الجينى لا يمكن استخدامها على المدى الطويل من العلاج الجينى فى علاج الأمراض الوراثية. وحتى فى وجود مثل هذه المشاكل فاستخدام هذه الفيروسات المعدلة جينياً كحاملات (Vectors) للجينات يساعد كثيراً فى توصيل الجينات المهلكة (Deadly genes) إلى الخلايا السرطانية حيث تكون الفترة القصيرة من التعبير الجينى للجين المهلك كافية لتدمير الخلايا السرطانية. ونظراً لأن عدد من السرطانات (Cancers) تنتج خلاياها البروتين المستقبل CAR بمستويات عالية فإن الغالبية العظمى من العلاج بالآدينوفيرس تكون موجهة حالياً إلى الخلايا السرطانية.



شكل (٩١): يوضح هندسة الآدينوفيرس جينياً لإستخدامه فى العلاج الجينى حيث يجب أن يكون طول الـ DNA فى الفيروس المعدل جينياً يماثل تماماً الـ DNA الموجود فى الفيروس الطبيعى والذي يحتوى على ٣٦ ألف زوج من القواعد وذلك لحدوث التجميع المناسب لجزيئات الفيروس الكاملة ويتم هندسة الفيروس جينياً على النحو التالى:

١- إحلال الجين العلاجى (Therapeutic gene) بالمنطقة (E₁).

٢- إذا كان الجين العلاجى أكبر من منطقة (E₁) فإنه يجب إزالة المنطقة التى تحمل الجين E₃ gene وذلك للحصول أو الاحتفاظ بالطول الثابت لطول الـ DNA الفيروس والمعدل جينياً والذي يماثل تماماً طول الـ DNA فى الفيروس الطبيعى.

العلاج الجينى لتليف الرئة بواسطة الادينوفيرس

Cystic Fibrosis Gene Therapy by Adenovirus

نظراً لأن الرئة (Lung) سهلة المنال للعدوى الفيروسية فإن تليف الرئة (Cystic fibrosis) يعتبر المرشح الأول للعلاج الجينى ، ولقد أمكن كلونة الجين الطبيعى السليم وأدخل فى ادينوفيرس مشلول (Crippled adenovirus) ومعاملة الفئران (Rats) بالفيرس المهندس وراثياً بالرش على الأنف والرئة ثم أجرى نفس الشئ بعد ذلك على الإنسان. ولقد وجد ظهور التعبير الجينى للجين السليم فى بعض الحالات وتم استعادة حركة أيون الكلوريد (Chloride ion) ولكن لسوء الحظ فشل هذا التعبير الجينى بعد فترة ٣٠ يوم وأن تكرار الجرعة من الفيرس المعدل جينياً كان ذات تأثيرها ضعيف ويرجع ذلك أساساً على تعرف النظام المناعى على الفيرس وتحطيمه ونأمل فى المستقبل القريب بان تحسين الحامل سوف يسمح بعلاج تليف الرئة بواسطة الرش بالأنف (Nasal sprays) بالفيرس المهندس جينياً ، ومع ذلك يجب ملاحظة أن هذا العلاج الجينى يعالج فقط الأعراض الموجودة فى الرئة ولكنه لا يصحح الفشل الوراثى فى الخلايا التناسلية حيث يظل يورث هذا الفشل الوراثى إلى النسل.

Retrovirus Gene Therapy

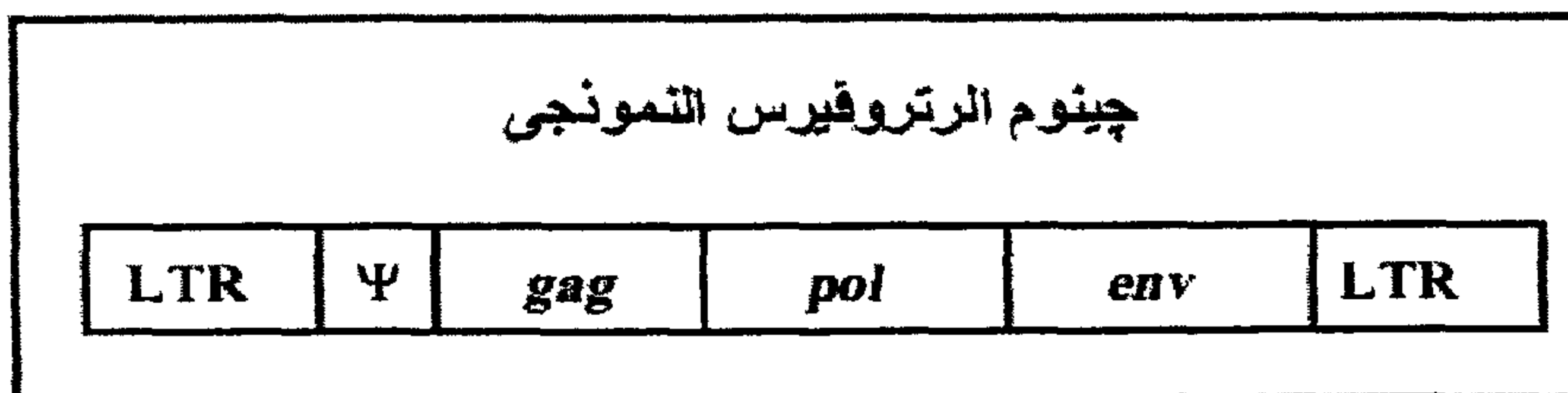
العلاج الجينى بالرتروفيرس

الرتروفيروسات (Retroviruses) هى مجموعة من الفيروسات التى تخزن معلوماتها الوراثية فى صورة خيط من الـ RNA والذى يتحول إلى خيط مزدوج من الـ DNA داخل الخلية العائلة عند حدوث العدوى. وهذه المعلومات الوراثية (الجينات) التى أصبحت فى صورة DNA وبعد ادماجها فى جينوم (DNA) الخلية العائلة تعمل مثل باقى جينات الخلية العائلة من تخليق جزيئات RNA فيروسية جديدة وكذلك تخليق كل البروتينات اللازمة لتكوين جزيئات الغلاف البروتينى الفيرس والتى يحدث لها تعبئه لتكوين جزيئات فيروسية جديدة كاملة التكوين. ويهاجم هذه المجموعة من الرتروفيرسات العديد من طرز خلايا الثدييات ولكى تحدث العدوى الناجحة بهذا الفيرس يجب أن تكون الخلايا العائلة فى مرحلة الانقسام الخلوى حيث أن هذا الطراز من الفيروسات لا يستطيع عدوى ومهاجمة الأنسجة التى توقفت خلاياها عن الانقسام الخلوى. ومع ذلك كانت الرتروفيروسات متميزة فى حمل أول جين للعلاج الجينى فى الإنسان.

Structure of Retrovirus particleتركيب جزيئى الرتروفيرس

يتركب جزيئى الرتروفيرس من غلاف بروتينى مزدوج أحدهما غلاف داخلى (Capsid) يحيط بالمادة الوراثية للفيرس (RNA) والآخر غلاف خارجى يتركب من طبقة مزدوجة من الدهون والذى يشتق من الغلاف السيتوبلازمى للخلية العائله والمادة الوراثية فى هذا الفيرس (RNA) تتركب من ثلاثة جينات تركيبية (Structural genes) وهى (شكل ٩٢):

- ١- الجين gag يحمل الشفرات اللازمة للتعبير عن البروتينات التى تدخل فى تركيب الماتركس (Matrix). وكذلك الغلاف البروتينى الداخلى.
- ٢- الجين pol يحمل الشفرات اللازمة للتعبير عن البروتينات التى تنتج إنزيم الـ Protease وإنزيم النسخ العكسى Reverse transcriptase والذى يقوم بنشاط إنزيم البلمرة DNA polymerase ونشاط إنزيم RNase-H أى أنه إنزيم ذو نشاط مزدوج وأيضاً إنزيم Integrase.
- ٣- الجين env يحمل هذا الجين الشفرات اللازمة للتعبير عن البروتين الذى يدخل فى تركيب الجليكوبروتين (Glycoprotein) الذى يدخل فى بناء وتركيب مواقع الاستقبال الفيرسية.



شكل (٩٢): الجينوم النموذجى للرتروفيرس (Typical retrovirus genome) حيث يحتوى على إشارة تجميع جزيئات الفيرس (ψ signal) والجينات gag, pol, env بين الطرفين المعروفين باسم LTR.

وبالإضافة للجينات التركيبية الثلاثة السابقة يحتوى الجينوم الفيرس (RNA) على ما يلى:

- أ- التتابعات النيوكليوتيدية المتكررة الطويلة والطرفية (Long Terminal Repeats (LTR) والتى تقع فى كل من الطرف 3' والطرف 5' من الـ RNA الفيرسى وهذه التتابعات النيوكليوتيدية (LTR) يحتاجها الفيرس فى ادماج نسخه الـ DNA للفيرس بجينوم (DNA) الخلية العائله.

ب-التتابع النيوكليوتيدى المعروف باسم ψ nucleotide sequences والمحصورة بين الجين gag والتتابعات النيوكليوتيدية (LTR) فى الطرف 5' من الـ RNA والتي تعطى الاشارة اللازمة لتعبئة جزيئات الـ RNA الفيروسيّة والبروتينات الفيروسيّة التى يتركب منها الغلاف البروتينى الفيرس لتكوين جزيئات فيروسيّة جديدة كامله. وتتلخص دورة تكاثر (Life cycle) هذا الفيرس (Retrovirus) داخل الخلية العائله فى الخطوات التالية:

(١) تبدأ دورة التكاثر بارتباط الفيرس الكامل بالخلية العائله عن طريق مواقع الاستقبال الموجودة على سطح الخلية العائله وتلك الموجودة على الغلاف الخارجى للفيرس والتي من خلالها يدفع الفيرس مادته الوراثية (RNA) والمحاطة بالغلاف الفيروسي الداخلى داخل الخلية العائله.

(٢) يحدث النسخ العكسى (Reverse transcription) لخيط الـ RNA الفيرس بواسطة إنزيم النسخ العكسى الفيروسي وتكوين خيط مفرد من الـ RNA والذى يتحول إلى جزيء من الـ DNA مزدوج الخيط بواسطة نفس الإنزيم.

(٣) يقوم إنزيم Integrase بادماج الـ DNA الفيروسي الناتج داخل جينوم (DNA) الخلية العائله.

(٤) تقوم الجينات الفيروسيّة التى تم إدماجها فى DNA الخلية العائله باستخدام كل مكونات الخلية العائله التى تتطلبها عمليات إنتاج جزيئات من الـ RNA الفيروسيّة الجديدة وكذلك البروتينات الفيروسيّة المختلفة التى تدخل فى تركيب الأغلفة الفيروسيّة وكذلك تلك التى تدخل فى تركيب مواقع الاستقبال الفيروسيّة وبالتالي يتم إنتاج كل هذه المكونات داخل الخلية العائله والتى تتجمع بعد ذلك لتكوين جزيئات فيروسيّة جديدة كاملة.

(٥) يحدث تبرعم (Budding) فى جزء من الجدار الخلوى للخلية العائله عند مواقع الاستقبال للخلية العائله وهذا التبرعم تخرج من خلاله جزيئات الفيرس الكامله من الخلية العائله وبذلك تنتهى عملية تكاثر الفيرس وخروج مئات من جزيئات الرتروفيرس (Retrovirus) الجديدة.

ولقد استخدم هذا الطراز من الرتروفيرس (Retrovirus) كحاملات للجين العلاجى حيث كانت متميزة فى حمل أول جين استخدم فى العلاج الجينى بنجاح فى الإنسان. وعند استخدام هذا الطراز من الفيروسات كحامل للجين العلاجى فإنه يجب نزع السلاح الذى تستخدمه فى تكاثره داخل الخلية العائله وهى الجينات التركيبية (Structural genes) الفيروسيّة الثلاثة السابقة الذكر وإحلالها بالجين المكلون (Cloned gene) (شكل ٩٣) أو الجين العلاجى وبالتالي فإنها لا

تستطيع أن تتكاثر داخل الخلية العائلة وتعرف مثل هذه الفيروسات باسم الفيروسات المعدلة جينياً والتي يجب أن تحتوى على التتابع النيوكليوتيدى الذى ينتج إشارة التعبئة وهو التتابع النيوكليوتيدى ψ وكذلك على التتابعات النيوكليوتيدية المتكررة الطويلة (LTR) فى كل من الطرف 5' والطرف 3' من خيط الـ RNA الفيّرس. وهذا الطراز من الفيروسات والمعدلة جينياً يمكنها أن تحمل ما بين 6000 إلى 8000 زوج من القواعد والتي يتم إدخالها فى الجينوم الفيّرس المعدل جينياً. ويقود البروموتور الفيّرس بالطرف 5' LTA التعبير الجينى للجين المكون (Cloned gene) أو الجين المنقول (T.G.).

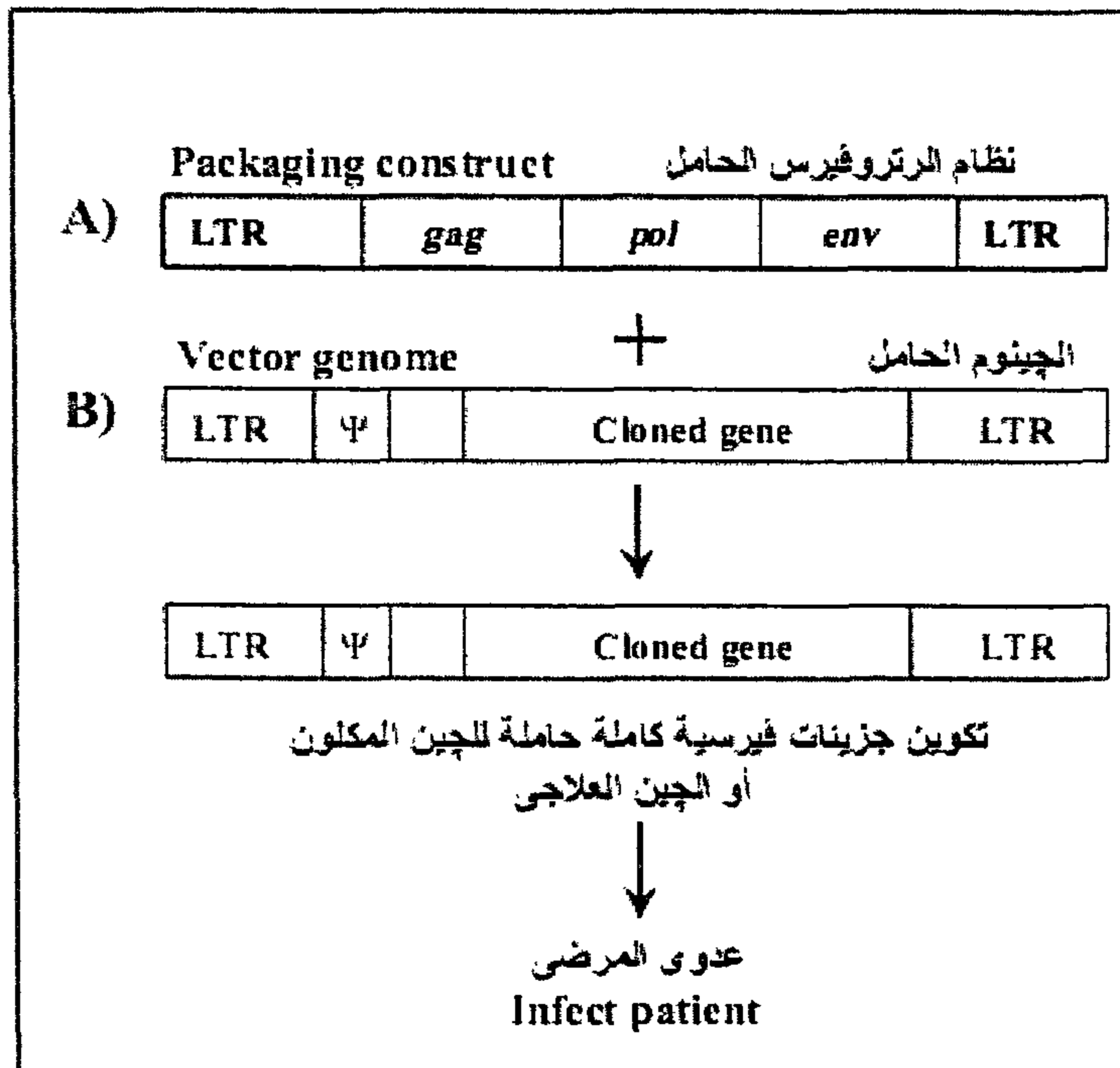
وبعد حدوث العدوى بهذا الفيّرس المعدل جينياً فإن الـ RNA الموجود داخله يحدث له نسخ عكسى لتكوين نسخه من الـ DNA على الرغم من أن هذا الحامل الفيّرس لا يحمل نسخه من الجين الذى ينتج إنزيم النسخ العكسى إلا أن قليل من حزيئات هذا الإنزيم تكون موجودة فى حزيئات الفيّرس. والصورة النموذجية لإستخدام الرتروفيّرس كحامل للجين العلاجى هى إحلال الجين المكون (Cloned gene) محل الجينات التركيبية الثلاثة gag و pol و env ثم بعد ذلك إدماج هذا الرتروفيّرس المعدل جينياً داخل الـ DNA للخلية العائلة.

والصورة النموذجية لإكثار هذا الطراز من الفيروسات لإستخدامها كحاملات للجين العلاجى (الجين المنقول) تكون بإستخدام طرازين مختلفين من هذا الرتروفيّرس فى عدوى الخلايا العائلة هما (شكل ٩٣):

١- الفيّرس الحامل للجين العلاجى (Therapeutic vector) والذى يحمل الجين المكون Cloned gene (الجين العلاجى) بدلاً من الجينات الثلاثة gag, pol, env.

٢- الفيّرس اللازم لتعبئة حزيئات كاملة ويسمى باسم (Packing construct) والذى يحدث له إدماج داخل DNA الخلية المنتجة ويحتوى على الجينات الثلاثة gag, pol, env ولكنه لا يحتوى على إشارة تعبئة الحزيئات الفيّرسية (ψ signal) وبالتالي فإنه لا يستطيع تعبئة نفسه وتكوين حزيئات فيّرسية كاملة من الفيّرس وعلى ذلك فإن حزيئات الرتروفيّرس الناتجة سوف تتكون فقط من الرتروفيّرس الحامل للجين المكون أو الجين العلاجى. وعندما يوجد كلا الطرازين من الفيّروسات السابقة داخل الخلية العائلة فإنه يحدث تجميع لحزيئات فيّرسية كاملة معدلة جينياً

يمكن استخدامها فى العلاج الجينى للحالة المرضية (شكل ٩٣). ونظراً لأن هذا الطراز من الفيروسات التى تستخدم كحاملات للجين المنقول (T.G.) أو الجين العلاجى تكون خالية تماماً من الجينات التى تنتج البروتينات الفيروسية فإنها لا تسبب حدوث استجابة مناعية وبذلك لا تسبب التهابات معنوية للأفراد المرضى كما أنها تمتاز بمقدرتها على الاندماج داخل الـ DNA للخلية العائلة وبذلك فإن الجين المستخدم فى العلاج الجينى والذى يحمله هذا الطراز من الفيروسات سوف يصبح جزء ثابت ومستديم من كروموسومات الخلية العائلة.



شكل (٩٣): النظام المستخدم لإكثار الرتروفيرس الحامل للجين المكلون أو الجين العلاجى والذى يتركب من:

- A-** رتروفيرس ناقص يحتوى على كل الجينات ماعدا إشارة التعبئة (Ψ) ويعرف ببناء التعبئة (Packaging construct) والذى يحدث له إدماج فى جينوم (DNA) الخلية المنتجة (Producer cell).
- B-** رتروفيرس يحمل الجين المكلون (Cloned gene) بدلاً من الجينات التركيبية الثلاثة *env*, *pol*, *gag* وتعرف باسم جينوم الحامل (Vector genome) للجين المكلون.
- وعندما يتواجد كلا من الطرازين من الرتروفيرس داخل الخلية العائلة سوف تتكون جزيئات فيروسية كاملة معدلة جينياً تحتوى على الجين المكلون (Cloned gene) تستخدم فى الأغراض العلاجية.

العلاج الجينى بالرتروفيروس لعلاج مرض نقص المناعة القاسية

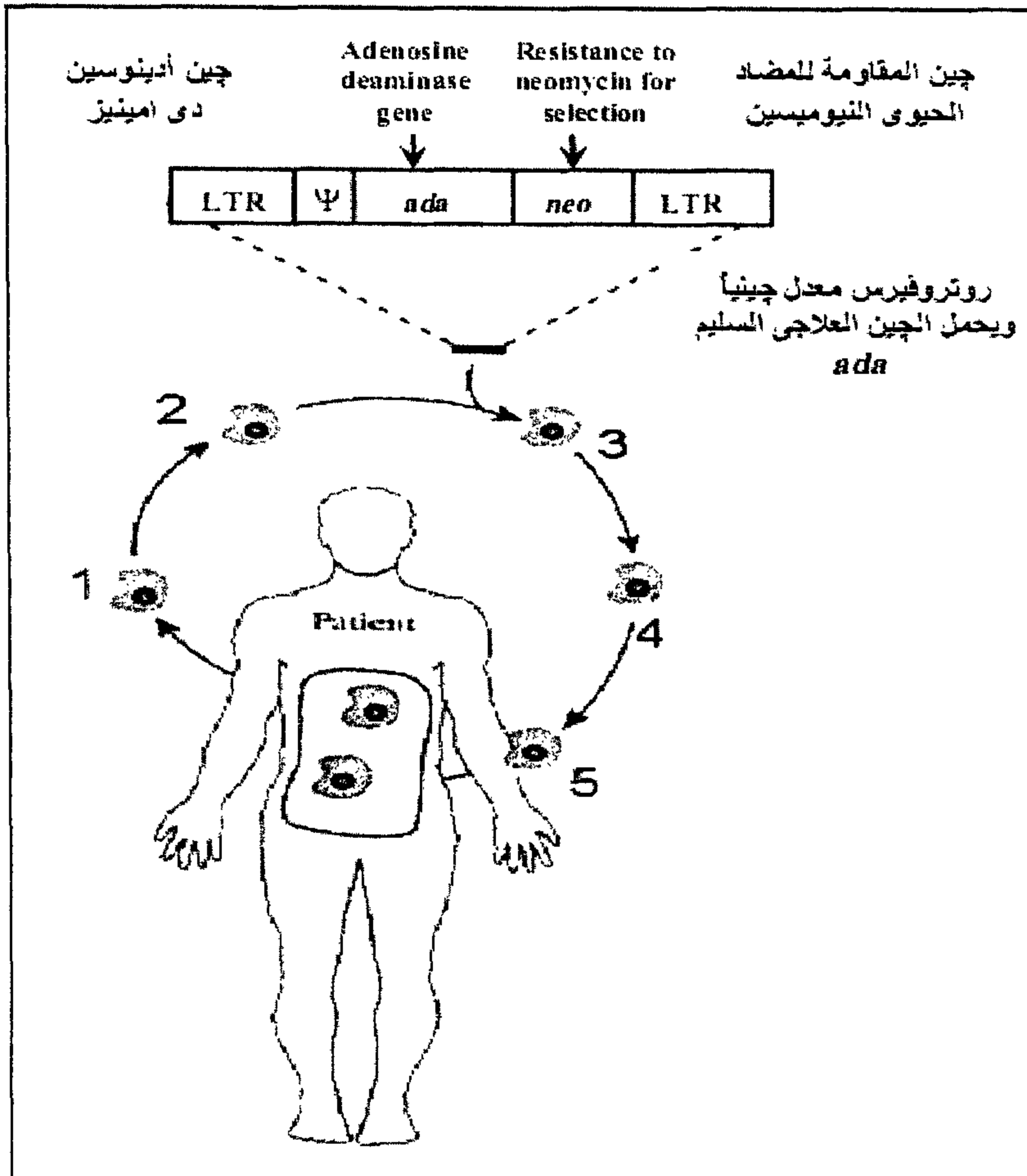
Retrovirus Gene Therapy for SCID

ينتج مرض نقص المناعة القاسية (SCID) Severe Combined Immuno Deficiency عندما تصبح كلاً من الخلايا المناعية من الطراز بيتا (β cell) والطراز التائي (T cells) غير فعالة وظيفياً، وغالباً ما ينتج عن ذلك نقص كامل للإستجابة المناعية. وتوضع الأطفال المرضى بهذا المرض (SCID) داخل غرف خاصة معقمة ومثل هؤلاء الأطفال المرضى تكون معرضة للهلاك أو الموت إذا لم يجرى حمايتهم مناعياً ضد أى مرض. وحوالى ٢٥% من حالات نقص المناعة القاسية (SCID) ترجع إلى حدوث طفرة فى الجين (Ada gene) والذي ينتج إنزيم Adenosine deaminase والضرورى لميتابوليزم القواعد البيورينية وأن غياب هذا الإنزيم يمنع تكوين خلايا الدم البيضاء وكذلك الخلايا المناعية من الطرز بيتا (β cells) والطراز التائي (T cells) والخلايا التى تتأثر بمرض نقص المناعة القاسية (SCID) هى الخلايا الليمفاوية (Lymphocytes) الموجودة فى مجرى الدم (الأوعية الدموية) التى تنتج الخلايا المناعية بواسطة الانقسام الخلوى لخلايا نخاع.

وأول محاولة ناجحة للعلاج الجينى فى الإنسان باستخدام الرتروفيروس (Retrovirus) كحامل للجين السليم أو الجين العلاجى كانت بإمداد الطفل المصاب بمرض نقص المناعة القاسية (SCID) بنسخه من الجين السليم Ada gene على النحو التالى (شكل ٩٤).

١. تجهيز أو تصميم الرتروفيروس المستخدم كحامل للجين السليم وهو الجين Ada gene وكذلك بالجين المخبر (R.G.) وهو فى هذه الحالة جين المقاومة للمضاد الحيوى النيوميسين (Neomycin).
٢. عزل خلايا نخاع (Bone-marrow cells) من الأفراد المرضى وتنميتها على بيئة لزراعة الخلايا.
٣. إضافة الرتروفيروس (Retrovirus) الذى يحمل الجين العلاجى أو الجين السليم Ada gene وكذلك الجين المخبر (R.G.) إلى هذه المرزعة الخلوية. وحدث التحول الوراثى لبعض الخلايا النامية بحصولها على الرتروفيروس الذى يحمل الجين العلاجى أو الجين السليم.

٤. إضافة المضاد الحيوى النيوميسين (Neomycin) إلى هذه المزرعة الخلوية والذي يؤدي إلى قتل الخلايا النامية التي لم يحدث لها تحول وراثى أى التي لم تحصل إلى الجين السليم بينما تظل الخلايا التي تحولت وراثياً بالرتروفيرس الذى يحمل الجين السليم .
٥. إنتخاب الخلايا التي حدث لها التحول الوراثى بحصولها على الجين السليم.
٦. توصيل هذه الخلايا المعدلة جينياً بالجين العلاجى أو الجين السليم مرة أخرى إلى جسم المرضى عن طريق الدم.



شكل (٩٤) : خطوات العلاج الجينى لمرض نقص المناعة القاسية (SCID) بواسطة الرتروفيرس

- ٢- تنمية الخلايا المعزولة من نخاع على البيئة الغذائية وإضافة الرترفيروس المعاد توليفه والذي يحتوى على جين Adenosine deaminase gene وجين المقاومة للمضاد الحيوى نيوميسين والتتابعات الطرفية (LTR).
 ٣- حدوث التحول الوراثى بالرتروفيروس الذى يحمل الجين السليم الذى يقوم بالوظيفة الطبيعية.
 ٤- انتخاب الخلايا المتحولة وراثياً.
 ٥- إعادة هذه الخلايا مرة أخرى إلى جسم المريض عن طريق الدم.

وفى عام ١٩٩١ تم معاملة عديد من الأطفال المرضى بمرض نقص المناعية القاسية (SCID) بهذه الطريقة ولكن نظراً لأن الخلايا المناعية التائية (T cells) تعيش لفترة ما بين ٦ إلى ١٢ شهر فقط فإنه يجب تكرار هذه الطريقة من العلاج الجينى السابقة على فترات متعددة ، ومع ذلك فقد أمكن حل هذه المشكلة باستخدام خلايا الدم الجذعية (Blood stem cells) والتي تنقسم لتعطى كل طرز خلايا الدم بما فيها الخلايا المناعية كما أنها تعطى أيضاً خلايا جذعية جديدة ونظراً لقلّة الخلايا الجذعية إلا أن الحبل السرى يحتوى على نسبة كبيرة من الخلايا الجذعية. وفى عام ١٩٩٣ تم الحصول على خلايا الدم الجذعية من الحبل السرى من عديد من الأطفال حديثى الولادة والمعروف انهم ممتاثلين (Homozygous) وراثياً بالنسبة للجين الطافر (Ada gene) ولقد تم إدخال الجين السليم (Ada gene) فى الرترفيروس كحامل إلى خلايا الدم الجذعية والذي أدى إلى تكوين الخلايا المناعية من الطراز التائى (T cells) لفترة طويلة.

الموصلات الطبيعية فى العلاج الجينى Normal Delivery In Gene Therapy

على الرغم من أن نظم التوصيل (Delivery) فى العلاج الجينى ربما تكون حوامل غير فيروسية والتي تورث بأمان إلا أنه أمكن تجاهلها وذلك لأن الفيروسات أكثر فعالية فى التوصيل الجينى. ومع ذلك فإنه لسوء الحظ حدثت عديد من الأعراض المرضية باستخدام الفيروسات كحاملات وخاصة الرترفيروسات (Retroviruses). وعلى الرغم من ذلك فإن ٧٥% من محاولات العلاج الجينى كانت تستخدم الفيروسات كحاملات فى العلاج الجينى. ولقد درست عديد من الطرق البديلة وأن قليل من هذه الطرق كانت فعالة وتستخدم على نطاق واسع وهذه الحاملات (Vectors) تشمل:

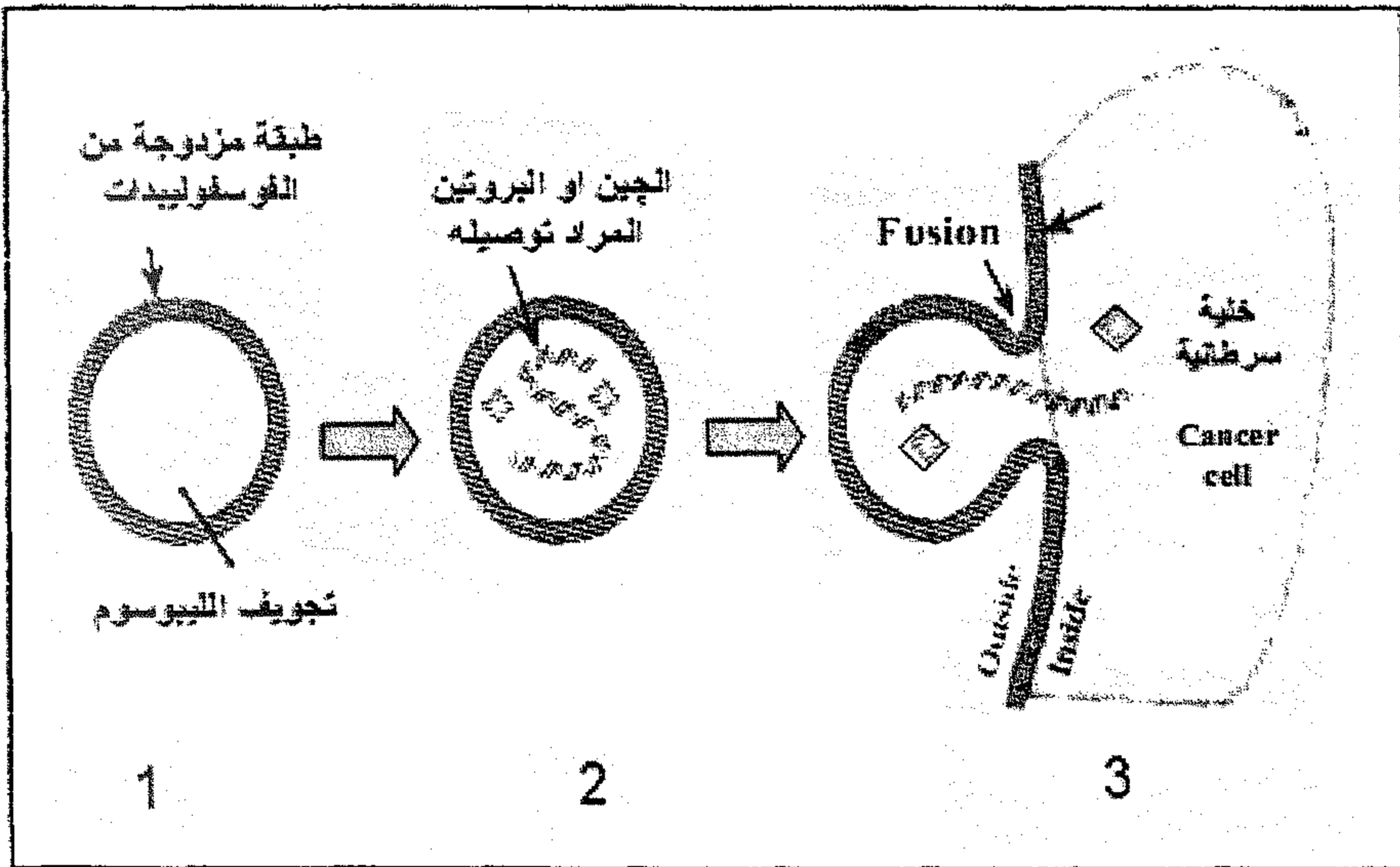
- ١- استخدام الـDNA العارى تماماً من البروتينات. فعدد من الخلايا الحيوانية يمكن تحويلها وراثياً مباشرة باستخدام الـDNA النقى. ولقد وجد أن حوالى ما بين ١٠% إلى ٢٠% من محاولات العلاج الجينى كانت تستخدم الـDNA العارى من البروتينات كحاملات للجين العلاجى.
- ٢- استخدام أداة قذف الجين (Particle bombardment) وفى هذه الطريقة يدفع الـDNA الذى يحمل الجين العلاجى خلال الجدر الخلوية وكذلك الأغشية الخلوية محمولاً على جزيئات معدنية. ولقد استخدمت هذه الطريقة أساساً لدفع الـDNA فى الخلايا النباتية ومع ذلك فإن هذه الطريقة استخدمت للحصول على حيوانات معدلة وراثياً وأحياناً تستخدم فى الإنسان.
- ٣- استخدام طريقة المستقبلات الخلوية (Receptor-mediated uptake). وفى هذه الطريقة يرتبط الـDNA أو الجين العلاجى ببروتين ما تستطيع الخلية التعرف عليه عن طريق تعرف المستقبلات الخلوية السطحية (Cell surface receptor) على هذا البروتين وعندما يدخل هذا البروتين الخلية المستقبلة يدخل معه الجين العلاجى إلى داخل الخلية المستقبلة.
- ٤- استخدام طريقة الجزيئات المتعددة Polymer-complexed DNA وفى هذه الطريقة يرتبط الـDNA أو الجين العلاجى بجزيئات متعددة polymer ذات شحنة موجبة مثل Polyethyleneimine حيث تحمل هذه الجزيئات الـDNA المحمل بشحنة سالبة ومثل هذه الجزيئات غالباً ما تمتص بواسطة الخلايا الموجودة فى المزارع الخلوية وأنه يمكن استخدامها فى العلاج الجينى من الطراز الخارجى (Exo-vivo gene therapy).
- ٥- استخدام طريقة الليبوسومات (Liposomes) وهى عبارة عن أوعية دائرية تتركب من فوسفوليبيدات (Phospholipids) ولقد تم استخدامها فى حوالى ١٠% من محاولات العلاج الجينى.

Liposomes Gene Therapy

استخدام الليبوسومات فى العلاج الجينى

الليبوسومات (Liposomes) هى دوائر مجوفة ميكروسكوبية من الفوسفوليبيدات (شكل ٩٥). ويمكن ملؤها بالجين العلاجى أو جزيئات أخرى وبالتالي يمكن استخدامها كحامل للجين العلاجى. وهذه الليبوسومات يمكنها أن تندمج بالأغشية المحيطة بمعظم الخلايا الحيوانية وبالتالي تدخل محتوياتها الخلية الحيوانية فى العملية المعروفة باسم Lipofection وعلى الرغم

من أنه يمكن استخدام الليبوسومات فى العلاج الجينى بطريقة جيدة إلا أنها ليست متخصصة لخلايا معينة وذلك لأن الليبوسومات تميل للاندماج بالأغشية الخلوية لأى خلية. وتعتبر طريقة استخدام الليبوسومات فى العلاج الجينى طريقة واعدة وذلك لأنه يمكن حقنها مباشرة إلى الأنسجة المتورمة وفى الحقيقة فإن الليبوسومات أكثر استخداماً فى توصيل البروتينات للخلايا أكثر من توصيل الـ DNA أو توصيل الجين العلاجى. فعلى سبيل المثال فإن البروتينات ذات التأثير السام مثل البروتين السام (Tumor Necrosis Factor (TNF يمكن تجميعه داخل الليبوسومات وحقنها فى النسيج المتورم مباشرة حيث تندمج الليبوسومات بأغشية الخلايا السرطانية وتحرر هذه البروتينات السامة أو المميتة من الليبوسومات إلى داخل الخلايا السرطانية.



شكل (٩٥): استخدام الليبوسوم فى توصيل البروتين العلاجى أو البروتين المضاد للنمو السرطانى:

١. الليبوسوم عبارة عن دائرة مجوفة يحاط بطبقة مزدوجة من الفوسفوليبيدات.
٢. ملأ الليبوسوم بالبروتين العلاجى (أو الجين العلاجى) مثل البروتين السام TNF.
٣. يتصل الليبوسوم بالغشاء الخلوى للخلية المرغوبه (الخلية السرطانية) ويحدث إندماج بينهما ويترتب على ذلك دفع الليبوسوم وما يحمله من البروتين العلاجى أو الجين العلاجى داخل الخلية السرطانية.

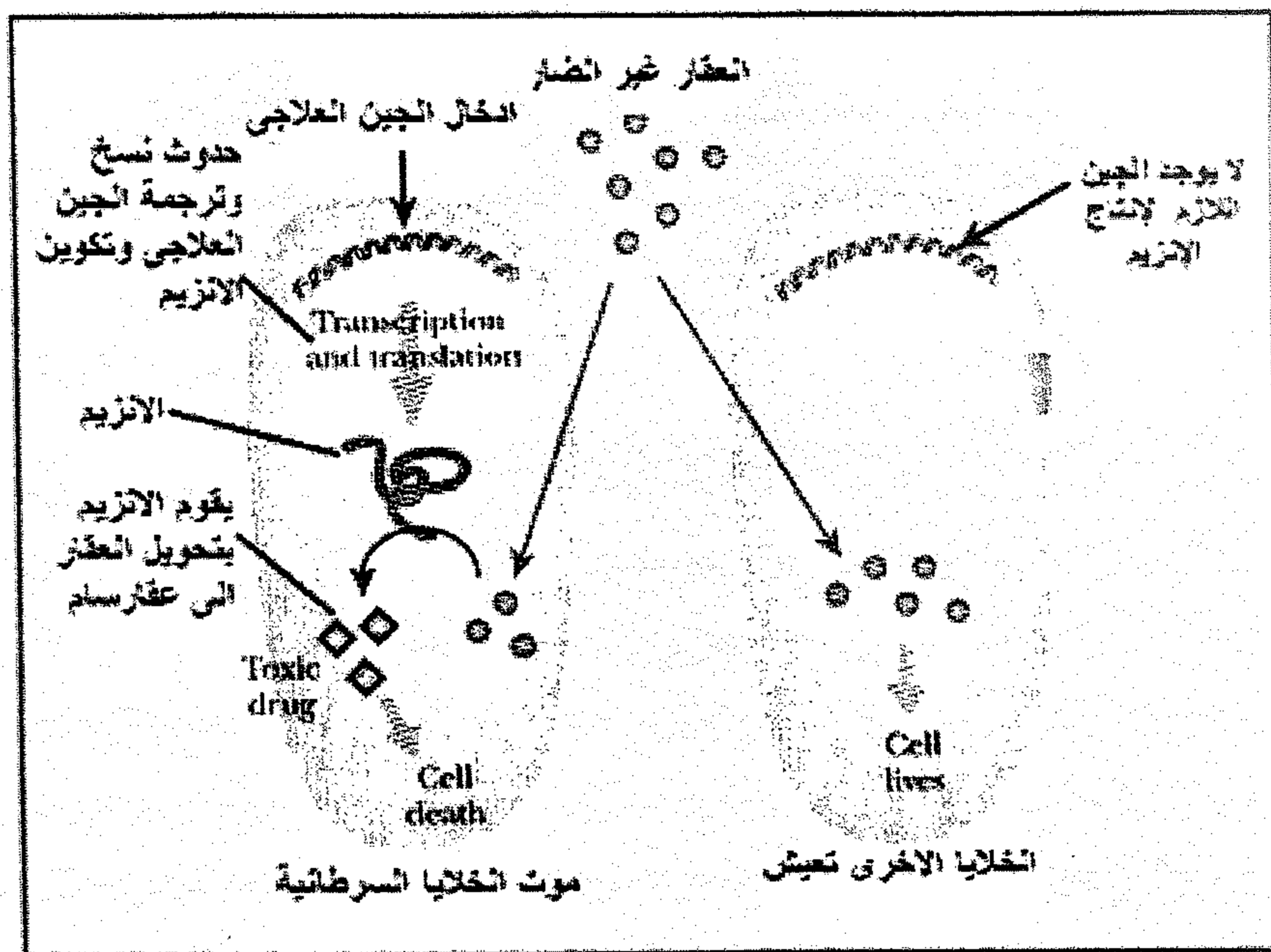
العلاج الجينى العدوانى للسرطانAggressive Gene Therapy for Cancer

على الرغم من أن معظم حالات السرطان (Cancer) لا تورث إلى النسل عن طريق الخلايا التناسلية (Germline) إلا أن السرطان هو مرض وراثى. والعلاج الجينى للمرض الوراثى يكون بإحلال الجين الطافر (الذى يسبب المرض) بجين آخر طبيعى. والعلاج الجينى للسرطان يكوت بتعطيم الخلايا السرطانية أو على الأقل تثبيط نموها ووقف انقسامها الخلوى المتتالى ومع ذلك تستخدم الطرق التالية للعلاج السرطانى:

أ- إحلال الجين (Gene replacement) وفى هذه الطريقة يجرى إحلال الجين الطافر الاونكوجين (Oncogene) بالجين المناظر الطبيعى أو ادخال الجين الذى يثبط الورم السرطانى إلى الخلايا السرطانية ويتم ذلك من خلال تحليل الحالة السرطانية وتحديد الطفرة الجينية أو الطفرات الجينية المسؤولة عن الورم السرطانى. فعلى سبيل المثال أمكن توصيل الجين الطبيعى p35 إلى الخلايا السرطانية التى تحتوى على الجين الطافر وطريقة التوصيل المستخدمة فى ذلك هى استخدام الادينوفيرس كحامل للجين العلاجى (الجين الطبيعى) وأحياناً يستخدم الليبوسوم فى توصيل الجين العلاجى للخلايا السرطانية.

ب- المهاجمة المباشرة (Direct attack) وفى هذه الطريقة يستخدم الجين الذى يساعد فى قتل الخلايا السرطانية مثل استخدام الجين TNF الذى ينتج البروتين ذو التأثير السام Tumor Necrosis Factor (TNF) والذى ينتج البروتين بواسطة خلايا الدم البيضاء المعروفة باسم Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TIL) والتى تتسرب طبيعياً إلى الخلايا السرطانية حيث يتحرر منها البروتين السام TNF والذى يكون فعالاً بصورة مناسبة فى قتل الأورام السرطانية الصغيرة وذلك لأن مهاجمة الأورام السرطانية الكبيرة يكون من الصعب التحكم فيها والتى تتطلب زيادة إنتاج البروتين السام TNF ويحدث العلاج الجينى بهذه الطريقة على النحو التالى:

١. كلونة الجين TNF بالحامل المناسب.
 ٢. عزل خلايا الدم البيضاء من المرضى وتنميتها فى مزارع خلوية.
 ٣. إدخال نسخ عديدة من الجين TNF فى الخلايا النامية فى المزارع الخلوية.
 ٤. تعزيز نشاط الجين TNF بإضافة المحفزات اللازمة لزيادة نشاطه فى خلايا الدم البيضاء.
 ٥. انتخاب الخلايا المعدلة جينياً والتي تحمل الجين TNF وحقنها مرة ثانية فى الأفراد المرضى.
- وعلى الرغم من أن البروتين السام (TNF) فعال لدرجة كبيرة فى قتل مثل هذه الخلايا السرطانية إلا أن له تأثير سام على الخلايا الأخرى غير السرطانية وبالتالي فإن المستويات العالية من هذا البروتين السام (TNF) لها تأثير خطير على الأفراد المرضى وللتغلب على ذلك يجب:
- ١- تحديد مستوى هذا البروتين السام (TNF) فى الخلايا المستهدفة فى داخل الورم السرطانى.
 - ٢- استخدام الرتروفيرس كحامل للجين الذى ينتج البروتين السام (TNF) وإضافة البروموتور المناسب لهذا الجين والذى يجرى تحفيزه بواسطة عوامل تستخدم بالفعل فى معالجة الخلايا السرطانية مثل الأشعة.



شكل (٩٦): العلاج الجيني الانتحاري (Suicide gene therapy) حيث يتم حقن الجين العلاجى فى الخلايا السرطانية والذي يقوم بإنتاج الإنزيم الانتحاري الذي يحول العقار غير الضار (Pro-drug) إلى مركب سام داخل الخلية السرطانية وبالتالي يكون تأثير هذا الجين على الخلايا السرطانية فقط ولا يكون للعقار المستخدم أى تأثير ضار على الخلايا الأخرى غير السرطانية.

ج- العلاج الجيني الانتحاري (Suicide Gene Therapy) وفى هذه الطريقة يجرى إدخال الجين العلاجى إلى الخلايا الهدف (الخلايا السرطانية) وهذا الجين يقوم بإنتاج إنزيم يقوم بتحويل العقار (Pro-drug) غير السام المستخدم فى العلاج إلى مركب له تأثير سام داخل الخلية السرطانية (شكل ٩٦). ونظراً لأن الخلايا غير السرطانية لا تحتوى على الجين الذى ينتج هذا الإنزيم والذي يعرف باسم الإنزيم الانتحاري فإنها لا تتأثر بالعقار المستخدم فى علاج السرطان. ويجرى إدخال الجين العلاجى الذى ينتج الإنزيم الانتحاري إلى الخلايا السرطانية المستهدفة عن طريق حوامل فيروسية معدلة جينياً لهذا الغرض أو باستخدام الليبوسومات كحامل للجين العلاجى. فإذا ظهر هذا الإنزيم بنجاح فى النسيج

المتورم فإنه سوف يتولد داخل الخلايا السرطانية المركب السام الناتج من تحويل العقار غير الضار إلى المركب ذو التأثير السام أو المميت للخلايا السرطانية وبالتالي فإنه يمكن إعطاء المرضى هذا العقار بوسائل طبيعية وبذلك يكون هذا العقار ذو تأثير مميت للخلايا السرطانية فقط.

مرض تليف الرئة Cystic fibrosis disease

مرض تليف الرئة هو أكثر الأمراض الوراثية شيوعاً في الولايات المتحدة الأمريكية والذي يصاب حوالي ٣٠٠٠٠ فرد. ويحدث هذا المرض عندما يرث الفرد الجينين الطافرين من الأبوين حيث يرث أحد الجينين من الأب والجين الآخر من الأم. والجين الطبيعي Cystic Fibrosis Transmembrane Receptor (CFTR) ينتج البروتين الذي ينظم تركيز أيونات ملح الكلوريد في الخلية والأفراد المرضى بتليف الرئة تنتج فقط البروتين الطافر cfr في خلاياها مسبباً ذلك زيادة المستويات العالية من أيونات الملح مما ترتب عليه دخول الماء إلى الخلايا والذي ينتج عنه تكوين مخاط لزج في مجرى الهواء مما يصعب معه التنفس. وعلى الرغم من أن الطفرة cfr في الأفراد الأصيلة للطفرة (cfr/cfr) تؤثر على كل الخلايا في الجسم إلا أن معظم التأثير الضار يكون في خلايا الرئة. وحوالي ١٠ مليون أمريكي يحملون هذا الجين في صورة خليطة (CTFR/cfr) ولكنها لا تقاسى من أعراض هذا المرض ولكن المخاطر البيولوجية تحدث للأطفال التي ترث كلا الجينين الطافرين (cfr/cfr) وتصبح مريضة بمرض تليف الرئة مما يسبب انخفاض أعمارهم وموتهم في سن مبكرة.

ولقد بدأ العلماء بالتركيز على استخدام العلاج الجيني لتليف الرئة لكل من أنسجة الرئة وأنسجة البنكرياس. وفي اختبارات العلاج الجيني الأولية قام العلماء بأخذ خلايا من رئة وبنكرياس الأفراد المرضى وزراعتها في مزارع خلوية لزراعة الأنسجة في المعمل واستخدموا حامل فيرسي لإدخال الجين الطبيعي (CFTR) إلى خلايا الرئة النامية وكذلك خلايا البنكرياس النامية في مزارع خلوية لزراعة الأنسجة وكانت هذه الخلايا مأخوذة من أفراد مرضى أصيلة (cfr/cfr) للجين الطافر. وقبل إجراء العلاج الجيني كانت خلايا الرئة وكذلك خلايا البنكرياس النامية في مزارع خلوية لزراعة الأنسجة تحتوي على مستويات عالية من الملح كما هو متوقع

ولكن بعد إجراء العلاج الجيني أظهرت خلايا الرئة وخلايا البنكرياس في المزارع الخلوية التعبير الجيني للجين الطبيعي (CFTR) وكذلك البروتين الناتج منه وأظهرت كلاً من خلايا الرئة وخلايا البنكرياس النامية في مزارع خلوية انخفاض كبير في مستويات الملح داخل الخلايا المعالجة بالعلاج الجيني.

مرض الخلايا المنجلية Sickle cell disease

مرض الخلايا المنجلية هو مرض وراثي خطير والذي يصيب فرد واحد من كل ٥٠٠ من الأمريكيان الأفارقة. وهذا المرض كان أول مرض وراثي في الإنسان تم اكتشافه والناتج عن حدوث الطفرة الجينية والتي ترتب عليها إحلال زوج من القواعد محل زوج آخر من جين بيتا جلوبيين (β -globin) والذي ترتب عليه إحلال الحامض الأميني فالين في البروتين الطافر محل الحامض الأميني جلوتاميك عند الموقع السادس في السلسلة بيتا جلوبيين. وعلى الرغم من أن هذا المرض تم اكتشافه منذ عام ١٩٥٧ إلا أن وضع طريقة للعلاج الجيني لهذا المرض مازالت محيرة حتى الآن.

وتغير هذه الطفرة تركيب الهيموجلوبين وهو المكون الرئيسي في خلايا الدم الحمراء والتي تقوم بنقل الأكسجين من الرئة إلى باقي أجزاء الجسم الأخرى. ويترتب على هذا البروتين الطافر أن تتحول خلايا الدم الحمراء الدائرية إلى الشكل المنجلي والتي تسبب مرض خلايا الدم المنجلية. والأفراد المريضة بهذا المرض يظهر عليها أعراض الأنيميا لأن خلايا الدم المنجلية في الأوعية الدموية الصغيرة تغلق التدفق الطبيعي للدم في الأنسجة والأعضاء المختلفة من الجسم. وفي عام ٢٠٠١ وضع العلماء طريقة من العلاج الجيني والتي كانت ناجحة في تصحيح وعلاج مرض خلايا الدم المنجلية في الفئران مما يوصى بأن العلاج الجيني سوف يكون ناجحاً أيضاً في علاج مرض الخلايا المنجلية في الإنسان.

ولقد استخدم العلماء الحامل الفيروسي المعروف باسم Lentiviral vector لتوصيل جين

بيتا جلوبيين الطبيعي إلى خلايا الفئران التي تنتج بروتين بيتا جلوبيين الطافر وهذه العائلة من

Lentiviruses هي إحدى عائلات الرتروفيروسات (Retroviruses) والتي من بينها فيروس نقص المناعة في الإنسان (HIV) والذي يسبب مرض الإيدز (AIDS). ولقد أجرى التحوير الوراثي اللازم لفيروس (Lentivirus) بعناية ليكون آمن حيث لا يستطيع التكاثر داخل خلايا الإنسان ولا يسبب المرض ولكنه كان فعالاً بكفاءة في نقل الجينات إلى مدى واسع من خلايا الإنسان العائلة المختلفة وهذه العائلة من فيروسات الـ Lentiviruses هي رتروفيروسات غير عادية لأنها تستطيع عدوى الخلايا غير النشطة في الانقسام الخلوي بينما الرتروفيروسات الأخرى يمكنها أن تعدي فقط الخلايا النشطة في الانقسام الخلوي. وفي الثلاثين عام الماضية استطاعت شركات التقنية الحيوية تطوير عدد من الحاملات الجينية الفيروسية والتي أصبحت متاحة تجارياً لمساعدة العلماء الإنتاج حوامل الجينات المناسبة لاستخدامها في الأبحاث الطبية الحيوية (Biomedicine) وكذلك لمساعدة العلماء في أكثر جزيئات الـ Lentivirus الحاملة للجين العلاجي لاستخدامها في العلاج الجيني.

العلاج الإنزيمي بالإحلال Enzyme Replacement Therapy

هي طريقة بديلة للعلاج الجيني حيث أمكن علاج بعض الأمراض الوراثية بنجاح بإمداد الأفراد المرضى بالجرعات المناسبة من الإنزيم الطبيعي والسليم وهذا النوع من العلاج يعرف بالعلاج الإنزيمي بالإحلال. فعلى سبيل المثال فالمصابين بمرض نقص المناعة القاسية والتي ينقصها إنزيم (MDA) Adenosine deaminase deficiency يجرى علاجهم بإمدادهم بالإنزيم الطبيعي السليم باستخدام العقار PEG-ADA والذي تم تخليقه بربط الإنزيم الطبيعي ADA بحامل لا يحدث له ميتابوليزم وهو مركب Polyethylene glycol (PEG). وهذا العقار يمد الخلايا المريضة بالإنزيم الطبيعي والسليم والفعال وظيفياً بدون حدوث أي أعراض جانبية للمرض إلا أن هذه العقار غالي جداً وأنه يجب حقن المرضى بالعقار طول حياتهم.

الباب الثانى عشر

البيولوجيا الجزيئية للسرطان

Molecular Biology of Cancer

What is Cancer ?

ما هو السرطان ؟

السرطان هو مجموعة من الأمراض التى تتصف بعدم التحكم فى نمو خلاياها وانقسامها الخلوى مكونة خلايا غير طبيعية وانتشارها بالجسم. ويتحدد حجم الأنسجة البالغة عن طريق التوازن بين نمو الخلايا الجديدة الناتجة عن الانقسام الخلوى وعدد الخلايا التى تموت والذى يعرف بالموت الخلوى (Apoptosis).

ويعرف التوازن الطبيعى بين الانقسام الخلوى والموت الخلوى بالهوميوستاسيس (Homeostasis) والذى يتم تنظيمه بصورة محكمة بواسطة الجينات التى تتحكم فى الانقسام الخلوى والموت الخلوى. وتنقسم هذه الجينات إلى مجموعتين هما:

١- البروتوونكوجينات (Proto-oncogenes) وهى الجينات التى تنتج البروتينات التى تنبه الانقسام الخلوى.

٢- الجينات المكبّنة للورم (Tumor-suppressor genes) وهى الجينات التى تنتج البروتينات التى إما تبطىء دورة الخلية أو تحفز الموت الخلوى.

والطفرات التى تسبب تنشيط البروتوونكوجينات بصورة مستمرة أو تجعل الجينات المكبّنة للورم غير فعالة تعمل على زيادة عدد الخلايا وبالتالي تخل من التوازن بين عدد الخلايا التى تنقسم خلويًا وعدد الخلايا التى تموت وتسمى هذه الزيادة بالهيبربلزيا (Hyperplasia) وهى أول خطوة فى نمو الورم مؤدياً ذلك إلى تكوين الورم الأولى.

وهذه الطفرات الأولية ينتج عنها نمو الورم ولكنه عادة ما تكون هذه الأورام حميدة ولا تسبب موت الكائن، ومع ذلك فإن هذه الأورام الأولية غالباً ما تكتسب طفرات إضافية عن طريق الانعزال الكروموسومى غير المناسب أو عن طريق المسرطنات (Carcinogens) الموجودة بالبيئة. والمسرطنات هى عوامل بيئية تسبب حدوث طفرات فى الـ DNA إما بحدوث الطفرات فى جينات معينة أو تغيير عدد الكروموسومات أو تركيبها والتي تؤثر على الانقسام الخلوى مما يؤدي إلى تقدم الورم السرطانى والذى يختلف من خلية لأخرى داخل الورم وحيث أن معظم الخلايا تموت نتيجة لهذه الطفرات فإن عدد قليل من الخلايا تكتسب المقدرة على الهروب من هذا الورم الأولى وتستقر فى مواقع متباعدة. وهذه العملية من هجرة الخلايا تعرف باسم ميتاستاسيس (Metastasis) وإذا اكتسبت هذه الخلايا السرطانية المقدرة على مهاجمة الأنسجة السليمة فيعرف السرطان فى هذه الحالة بإسم الورم الخبيث (Malignant) ويصبح المرض مهدداً للحياة.

ويظل السرطان من أحد الأمراض المخيفة فى العالم فى الولايات المتحدة يظهر سنوياً أكثر من مليون حالة سرطان جديدة وكذلك يحدث موت لحوالى ٥ مليون فرد سنوياً بسبب السرطان. وأكثر طرز السرطان شيوعاً وانتشاراً فى الولايات المتحدة هو سرطان البروستاتا فى الذكور وسرطان الثدي فى الإناث. وفى كلا الطرازين من السرطان فإن التحديد المبكر يسمح بإجراء عديد من المعاملات الفعالة فى إزالة الورم السرطانى. وعلى العكس من ذلك فإن الطرز الأخرى من السرطان مثل سرطان البنكرياس أو سرطان الرئة مازال علاجها محدوداً وأكثرها سبباً فى حدوث الموت السريع.

وعادة لا يورث السرطان داخل العائلة ولكن القابلية للنمو السرطانى يمكنها أن تورث فى بعض حالات السرطان وعادة ما يحتاج النمو السرطانى إلى تجميع عديد من الطفرات الجسمية (Somatic mutations) التى يتكون بعضها تلقائياً والبعض الآخر تستحدث عن طريق العوامل البيئية مثل أشعة X (X-rays) والأشعة فوق البنفسجية.

المسرطنات Carcinogens

أقل من ١% من الأورام فى الإنسان هى أورام وراثية أو أمراض عائلية. وعلى الرغم من أن الأفراد التى تاريخها العائلى بالنسبة للسرطان لديها القابلية للإصابة بالسرطان أو أكثر تعرضاً للنمو السرطانى عن باقى العشيرة فإن ليس كل أفراد العائلة يحدث بها النمو السرطانى. وعلى العكس من ذلك فإن أكثر من ٩٠% من حالات الأورام السرطانية فى الإنسان تنشأ تلقائياً.

ومعظم هذه المسرطنات الطبيعية الموجودة من تلوث الهواء مثل دخان السجائر وتلوث الغذاء والذي غالباً ما يكون بسبب ناتج عملية طهى الطعام، ونسبة صغيرة من هذه الأورام التلقائية تكون أيضاً نتيجة للطفرات التى تنشأ أثناء التضاعف الطبيعى للـDNA وعملیات اصلاح (Repair) الـDNA وكذلك بواسطة الضرر الذى يحدث للـDNA أو بسبب العدوى الفيروسية ولقد قدر ان جسم الإنسان يخضع إلى حوالى ١٠٠٠٠ حالة ضرر (Lesions) لكل يوم والتي عادة ما يحدث لها اعادة اصلاح وعندما لا يحدث اعادة اصلاح لهذه الطفرات تتزايد خطورة النمو السرطانى. وتنقسم المسرطنات إلى ما يلى:

Chemical Carcinogens

١- المسرطنات الكيميائية

تقع المسرطنات الكيميائية فى ثلاثة أقسام عامة وهى:

- 1-Alkylating agents
- 2-Aralkylating agents
- 3-Arylhydroxylamines

وهذه المركبات الكيميائية إما أنها تتفاعل بصورة حقيقية مع الـDNA أو يحدث لها ميتابولزم داخل الجسم والتي تتفاعل مع الذرات الحاملة للإلكترونات فى نيوكليوتيدات الـDNA خصوصاً فى ذرات النيتروجين الحلقية وذرات الأكسجين لتكوين نيوكليوتيدات متحورة بصورة دائمة تعرف باسم DNA adducts .

ومعظم هذه المسرطنات تمتص خلال الرئة والأمعاء وتهاجر خلال الجهاز الدورى والجهاز الليمفاوى إلى الكبد حيث يحدث لها ميتابولزم بواسطة مجموعة من الإنزيمات تعرف باسم P540 mixed function oxidases وهذه الإنزيمات هى أحد أعضاء عائلة السيتوكروم Cytochrome P450(CYP). ولسوء الحظ فإن ميتابولزم هذه المسرطنات يجعل المسرطنات المباشرة أكثر وصولاً للدخول فى الخلايا الهدف وفيها يحدث لها ميتابولزم آخر عن طريق إنزيمات السيتوكروم (CYA) الخاصة بالنسيج لتصبح فى النهاية مسرطنات أقوى وأنشط. وهذا المسرطن النهائى يكون روابط تعاونية مع نيوكليوتيدات الـDNA مسبباً تخليق تحورات دائمة فى الـDNA.

وتفاعل هذه الإنزيمات لإنتاج المسرطن النهائى يوضح لماذا أنه بالإضافة لحدوث سرطان الرئة فإن التدخين يزيد من خطر السرطانات الأخرى مثل سرطان الثدي والبروستاتا.

وتنتقل المسرطنات المباشرة الناتجة عن التدخين من الكبد إلى الانسجة الهدف حيث يحدث لها هناك التحول إلى المسرطن النهائي.

ويؤدى التحور الدائم فى الـDNA الناتج عن هذه المسرطنات إلى تحوير التركيب الثانوى للـDNA بصورة معنوية نتيجة لحدوث الاقتران الشاذ بين أزواج القواعد. وتختلف طبيعة التحور الدائم فى الـDNA تبعاً لنوع المادة المسرطنة فقد يكون كبيراً جداً أو تحور دائم بسيط باضافة مجموعة ميثايل مفردة للـDNA.

وهذه التحورات الدائمة فى الـDNA يتعرف عليها إنزيمات اصلاح الـDNA حيث تقوم هذه الإنزيمات بأستئصال هذه التحورات من الـDNA قبل حدوث تضاعف الـDNA. ومع ذلك فاذا لم يحدث اصلاح للتحور الدائم فى الـDNA فإن إنزيم بلمرة الـDNA (DNA polymerase) يقرأ هذه النيوكليوتيدات المتحورة ويضع النيوكليوتيده غير الصحيحة فى خيط الـDNA الجديد. وفى معظم الحالات ينتج عن ذلك طفرات تشمل زوج من النيوكليوتيدات تعرف بالطفرات الموضعية (Point mutations) والتي تورث إلى الخلايا الشقيقة بعد الانقسام الخلوى.

ويعتمد تأثير الطفرة الموضعية على مكان حدوثها فى الـDNA. ومن حسن الحظ أن معظم هذه الطفرات الموضعية لا تؤثر على الشكل المظهرى (Phenotype) للخلية بسبب حدوثها فى مناطق الانترونات (Introns) من الجينات أو حدوثها فى القاعدة الثالثة من الشفرة والذى ينشأ عنه تكوين شفرة أخرى لنفس الحامض الأمينى (المرادفات فى الشفرة الوراثية) وبالتالي لا يحدث احلال أو تغيير للحامض الأمينى رغم حدوث الطفرة. ومن ناحية أخرى فإن الطفرات الموضعية التى تحدث فى الاكزونات (Exons) من الجينات تؤثر على تتابع الاحماض الامينية فى البروتين ويترتب على ذلك تكوين بروتين طافر. فاذا كان هذا البروتين هو أحد البروتينات التى تنظم الانقسام الميتوزى (Mitosis) أو الموت الخلوى (Apoptosis) فسوف يحدث زيادة فى عدد الخلايا وينتج عن ذلك تكوين الورم الاولى الذى يعرف بالهيبربلزيا (Hypersplasia).

Environmental carcinogens

٢- المسرطنات البيئية

عديد من المسرطنات وليس كلها يتم تخليقها بواسطة الإنسان ويزيد التعرض للمسرطنات البيئية من مدى حدوث عديد من انواع السرطانات المختلفة. فعلى سبيل المثال يحفز المركب

الكيميائي Benzo (a) pyrene (وهذا المركب وجد في دخان السجائر) زيادة مخاطر سرطان الرئة كذلك فإن التعرض لهذا المركب الكيميائي يزيد من مخاطر سرطان الثدي وسرطان البروستاتا ويرجع ٣٠% من حالات السرطان المميتة في الإنسان إلى دخان السجائر وبذلك يعتبر من أكثر المسرطنات الهامة في البيئة.

وبعض المركبات الكيميائية الطبيعية تسبب تحورات دائمة في الـ DNA ومنها على سبيل المثال مركب افلاتوكسين B1 (Aflatoxin BI) والذي يعتبر ناتج طبيعي ينتجة فطر العفن *Aspergillus flavas* والذي يلوث الحبوب والخضروات والجوز في عدد من مناطق العالم خصوصاً في جنوب شرق آسيا وأفريقيا الوسطى ويحدث لمركب افلاتوكسين ميتابولزم بواسطة ثلاثة إنزيمات من إنزيمات السيتوكروم (CYP) على الأقل ويسبب هذا المركب تحورات في الـ DNA بسبب تفاعله بالنيتروجين رقم ٧ في قاعدة الجوانين مكوناً مركب



والذي يؤدي إلى سرطان الكبد. ولقد اتضح أيضاً أن استهلاك اللحوم الحمراء والدهون الحيوانية لها دور في تكوين طرز معينة من السرطانات مثل سرطان القولون والثدي والبروستاتا ولكن ليس واضحاً تماماً كيف تؤدي هذه الأغذية إلى تسهيل تقدم ونمو الورم السرطاني.

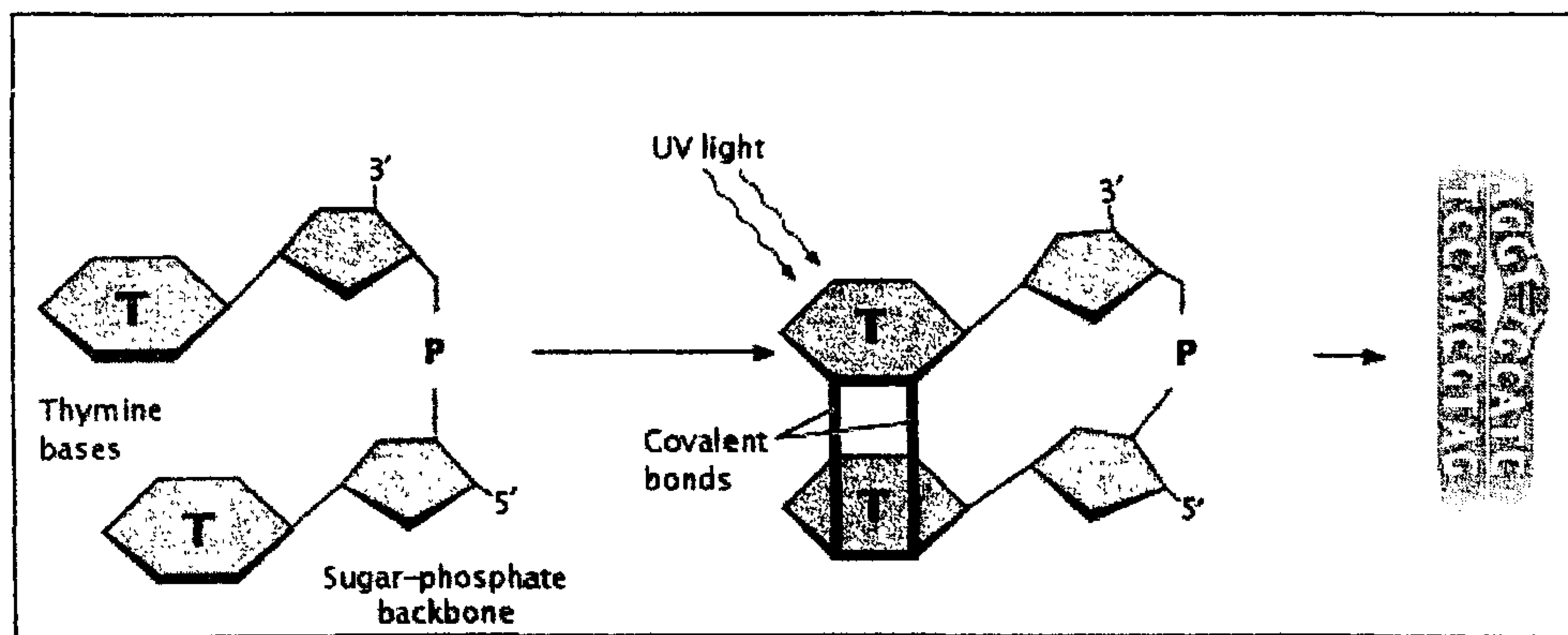
Radiation

٣- الأشعة

من المعروف أيضاً أن الأشعة تحفز تكوين الورم السرطاني فالأشعة فوق البنفسجية خاصة التي طول موجتها ما بين 280-320nm تحفز تكوين تحور دائم بالـ DNA يعرف باسم Thymine dimer والذي هو ارتباط قاعدتين من الثيمين المتجاورتين في الـ DNA ببعضهما مما يؤدي إلى تشويه الحزون المزدوج للـ DNA (شكل ٩٧). وإذا لم يحدث إعادة اصلاح لذلك عن طريق استئصاله فإنه يسبب احلال لزوج القواعد A-T بدلاً من G-C أو يسبب طفرات تغيير القالب الشفري.

ونظراً لأن الأشعة فوق البنفسجية لا تنفذ إلى أبعد من الطبقات الأولى من الجلد فإن الأورام التي تحفز بواسطة الأشعة فوق البنفسجية تكون محدده بسرطانات الجلد ولكن مثل هذه

الأورام تكون حميده ويسهل علاجها. ويوجد طراز آخر من سرطان الجلد يعرف بالميلانوما الخبيثة (Malignant melanoma) يحفز عن طريق الأشعة فوق البنفسجية وهو سرطان قاسى ويصعب علاجه. كذلك يحتاج هذا الطراز من النمو السرطانى إلى عوامل أخرى منها التعرض الكثيف للضوء وللشمس القاسيه وربما يرجع ذلك إلى تحرر السيروتوكروم من الخلايا المناعية فى الجلد والتي حدث لها تنبيه بواسطة التعرض للشمس القاسية.



شكل (٩٧): تعرض الخلايا للأشعة فوق البنفسجية حيث ينتج عن ذلك تكوين روابط شاذة بين قاعدتين من الثيمين المتجاورتين فى نفس خيط الـ DNA يعرف باسم Thymine dimer مؤدياً إلى انبعاج خيط الـ DNA والأشعة المتأينة بما فيها أشعة X وأشعة جاما تسبب أكسدة النيوكليوتيدات مثل أكسدة الجوانين (8-Hydroxyguanine) وإذا لم يحدث لها إعادة اصلاح سوف يحدث ادخال بطريقة الخطأ للثيمين بدلاً من الجوانين فى الـ DNA بواسطة إنزيم البلمرة DNA polymerase وبالتالي ينتج عن ذلك احلال قاعدة بيريميدينية محل قاعدة بيورينية.

وتسبب الأشعة المتأينة أيضاً حدوث كسور مفردة فى أحد خيطى الـ DNA أو كسور مزدوجة فى كلا خيطى الـ DNA. وعلى الرغم من أن هذه الكسور يحدث لها إعادة اصلاح داخل الخلية إلا أن دقة هذا الاصلاح تعتمد على عدد من العوامل منها عدد الكسور فى خيطى الـ DNA التى تحدث فى نفس الوقت والمرحلة من دورة الخلية. كذلك ينتج عن الكسور المزدوجة حدوث نقص (Deletion) اثناء الانقسام الخلوى. ومعظم الخلايا التى يحدث لها ضرر شديد فى الـ DNA تخضع

للموت الخلوى. والخلايا التى تحتوى على تحورات كبيرة فى الـDNA غالباً ما تسبب الورم وذلك لتمزيق جينات تنظيم الانقسام الخلوى بصورة معنوية.

٤- الفيروسات المسرطنة Viral Carcinogens

تسبب العدوى الفيروسية حوالى ما بين ٥% إلى ١٠% من كل حالات السرطان فى العالم. وفى عديد من الحالات السرطانية فإنه بعد ادماج الجينوم (DNA) الفيروسى بجينوم (DNA) الخلية العائله يحدث إنتاج للبروتينات الفيروسية والتى تعارض تنظيم الانقسام الخلوى او التحكم فى دورة الخلية (Cell cycle) فى الخلايا المعدية بالفيروس حيث يحدث لها نمو عن الخلايا المجاورة مسبباً ذلك الهييربلزيا وتعزيز انقسام هذه الخلايا. وبعض الفيروسات مثل ابستين- بار فيروس (Epstein-Bar Virus) تكون مرتبطة بحدوث انتقالات للـDNA ينتج عنها إنتاج كبير من البروتينات التى تنبه دورة الخلية والانقسام الخلوى. وبعض الفيروسات الأخرى مثل فيروس Hepatitis B ينتج عنها التهابات شديدة يترتب عليها تنبيه الانقسام الخلوى بصورة غير ملائمة. وعلى الرغم من أن بعض طرز الـرتروفيروسات (Retroviruses) التى تسبب السرطان فى الدجاج والفئران كانت فى غاية الأهمية فى اكتشاف الجينات المسرطنة إلى أن عدد قليل من حالات السرطان فى الإنسان ترجع إلى بعض طرز الـرتروفيروسات. ومن الفيروسات الأكثر شهرة والتى تصيب الإنسان هو فيروس الإيدز (AIDS) Acquired Immuno Deficiency Syndrome الذى يشل النظام المناعى فى الإنسان. وعلى الرغم من أن بعض المرضى بمرض نقص المناعة (الإيدز AIDS) تموت نتيجة للسرطان إلا أن الفيروس نفسه لا يسبب السرطان بطريقة مباشرة ولكنه يقوم بشل النظام المناعى الذى يهاجم ويقتل الخلايا السرطانية فى المرضى قبل أن تصبح فى مرحلة يصعب التحكم فى السرطان.

وأول حالة حقيقية اكتشفت لبعض طرز الـرتروفيروسات التى تسبب السرطان هى فيروس Rous Sarcoma Virus (RSV) حيث انتزع هذا الفيروس منذ فترة طويلة نسخه من الجين المسرطن من الدجاج (العائل) وهو الجين المسرطن src oncogene . ومن المعروف أن جينوم طرز الـرتروفيروسات هو الـRNA وليس الـDNA فعندما يقوم فيروس (RSV) بمهاجمة الدجاج يتحول الـRNA الفيروس داخل الخلية العائلة إلى الـDNA عن طريق النسخ العكسى للـRNA بواسطة

إنزيم Reverse transcriptase ثم يندمج بعد ذلك هذا الـ DNA الفيروسي داخل جينوم (DNA) الخلية العائلة برفقة الجين المسرطن src oncogene الذى يحمله ويسبب التعبير الجينى لهذا الجين المسرطن أورام العضلات المعروفة باسم ساركوما (Sarcomas).

وترجع حوالى ١٥% من حالات السرطان فى الإنسان إلى الفيروسات التى مادتها الوراثية هى الـ DNA مثل فيروسات Papilloma وفيروسات Herpes وهذه الفيروسات التى تسبب أوراماً سرطانية ترجع إلى أنها تغلق الطريق أمام الجينات الخلوية التى تكبت (Repress) النمو السرطاني وهى الجينات المكبته (Suppressor genes) وذلك لأن الفيروس المسبب للسرطان يدمج مادته الوراثية (DNA) فى أحد كروموسومات الخلية العائلة ثم يقوم الفيروس بتخليق البروتينات الفيروسية والتى توجد جيناتها فى الـ DNA الفيروسي ثم تقوم هذه البروتينات الفيروسية بالارتباط بالبروتينات الخلوية التى تثبط الانقسام الخلوى والتى يقوم بإنتاجها الجينين p53, Rb1 ويجعلها غير قادرة على تثبيط الانقسام الخلوى مرة أخرى والذى يؤدي فى النهاية إلى تكوين الورم السرطاني. ومن الفيروسات المسرطنة مايلي:

١- فيروس البابيلوما فى الإنسان Human Papilloma Virus (HPV)

يوجد أكثر من ١٠٠ سلالة من هذا الفيروس (HPV) ومعظمها لا تسبب أذى أكثر من تكوين نتوء ورمى صغير. ومع ذلك يوجد سلالتين من هذا الفيروس هما: HPV-16 و HPV-18 متورطة فى سرطان عنق الرحم (Cervical cancer). وتنتقل هاتين السلالتين عن طريق العلاقة الجنسية حيث يقوم بمهاجمة خلايا عنق الرحم (Cervix). وهذه الطريقة من الانتقال توضح مدى خطورة العلاقة الجنسية مع عديد من الأشخاص كأحد العوامل لحدوث هذا السرطان.

والآلية التى يسبب بها هذين الطرازين من الفيروسات تحفيز سرطان عنق الرحم تشتمل على بروتينين فيرسيين وبروتينين خلويين تنتجها الخلية العائلة حيث يحمل الجينوم الفيروس شفرات البروتين E6 والبروتين E7 بينما توجد شفرات البروتين Rb1 (Relimaplasma) والبروتين P53 على جينوم (DNA) الخلية العائلة. وكلاً من البروتين Rb1 والبروتين P53 فى غاية الأهمية لتنظيم الانقسام الخلوى أو تنظيم دورة الخلية. ويرتبط البروتين الفيروسي E6 بالبروتين P53 ويجعله غير نشط بينما

يرتبط البروتين الفيروسي E7 بالبروتين Rb1 ويجعله غير نشط أيضاً. وفقد نشاط كلا البروتينين (P53, Rb1) فى الخلايا المعدية بأى من الفيروس HPV-16 أو HPV-18 ينتج عنه الورم الأولى (الهيبربلزيا) وفى النهاية تكوين السرطان وذلك لمعارضة البروتينات الفيروسية تنظيم الانقسام الخلوى للخلية العائلة.

٢- الادينو فيروس و البليوما فيروس Adenovirus and Polyomavirus

يوجد عديد من الجينات المسرطنة فى جينوم (DNA) عديد من الادينو فيروسات والبليوما فيروسات التى منها فيروس السيمين (SV40) Simian virus. وتحمل هذه الجينات أيضاً شفرات البروتينات التى تحفز دورة الخلية وتسبب ابتداء تكوين الورم. فالادينو فيروسات تحمل شفرات نوعين من البروتينات هما E1A و E1B والذان يرتبطان بالبروتينات الخلوية P53, Rb1 وتجعلهما غير فعالين وظيفياً.

وينتج الفيروس SV40 بروتين يعرف باسم large T antigen والذى يرتبط بكل من البروتين الخلوى P53, Rb1 ويغلق تأثيرهما فى تنظيم دروة الخلية وينتج عن ذلك تحفيز ابتداء تكوين الهيبربلزيا ولكنه جعل الخلايا أكثر قابلية لحدوث مزيد من الطفرور الوراثى وذلك لان جعل البروتين P53 غير نشط يؤثر أيضاً على عمليات اصلاح الـDNA.

٣- إبستين- بار فيروس Epstein-Bar virus (EBV)

يهاجم هذا الفيروس بصفة سائدة الخلايا البائية (B cells) الأولية ويحفز تكوين الهيبربلزيا. ومهاجمة الخلايا الطلائية (Epithelial) بالفيروس EBV يسبب زيادة تعبير عامل نمو الخلايا البائية (B cells) وهو العامل BCRF1 والذى يشبط أيضاً التأثير السام للخلايا التائية (T cells) وينبه عامل النمو BCRF1 الانقسام الخلوى للخلايا البائية كما يحميها من المراقبة المناعية للتأثير السام للخلايا التائية (T cells).

ويحمل الفيروس EBV شفرات بروتينين هما EBNA-1 و EBNA-2 اللذان تتطلبهما حدوث العدوى وكذلك حيوية الخلايا البائية (B cells) ويتفاعل البروتين EBNA-2 على وجه الخصوص مع

عديد من عوامل النسخ لزيادة تعبير البروتين الخولى Myc وهو البروتين الذى يتحكم فى التعبير الجينى لعدد من الجينات التى تنتج عديد من البروتينات المنظمة لدورة الخلية. وفى المناطق من العالم التى تنتشر (Endemic) بها الملاريا يحدث تنبيه لانقسام الخلايا البائية (B cells) فى الأفراد المصابة بطفيل الملاريا وكذلك يخضع هؤلاء الأفراد المصابة بالملاريا لحدوث انتقال كروموسومى متبادل بين الموقع الجينى Myc على الكروموسوم الرابع عشر فى الخلايا البائية (B cells) التى حدث لها بالفعل تنبيه للانقسام الخولى. ويؤدى هذا الانتقال الكروموسومى إلى وضع الجين Myc تحت تحكم بروتين قوى وينتج عن ذلك إنتاج مستوى عالى من البروتين c-Myc خلال دورة الخلية. ونظراً لأن هذا البروتين ينظم نسخ جينات السيكلين (Cyclin genes) والتى تتحكم فى مراحل دورة الخلية فإنه يحدث انقسام خولى للخلايا بسرعة كبيرة منتجاً ورم كبير يعرف باسم Burkitt lymphoma وهو اسم الرجل الذى اكتشف به هذا الورم لأول مره فى شرق آسيا.

٤- فيروسات تليف الكبد B و C Hepatitis B and C Viruses

السرطان الآخر المرتبط بالعدوى الفيروسية هو سرطان الكبد. فلقد وجدت علاقة تلازمية قوية بين العدوى بكل من فيروس تليف الكبد B و C وورم الخلايا الكبدية وبتقدم هذا المرض يحدث تليف للكبد الذى يسببه العدوى الفيروسية وإساءة استخدام الكحول وكذلك الأمراض التى تسبب التهابات حاده بالخلايا الكبدية.

وعندما نتعرض خلايا الكبد الطلائية للسيتوكينين (وهو عامل النمو يفرز بواسطة الخلايا الملتهبة) لفترة طويلة يوجه خلايا الكبد للدخول فى دورة الخلية بصورة أسرع من دورة الخلية الطبيعية. ولقد أوضحت النتائج انه يحدث عدم تنشيط للجين P53 فى المراحل المتأخرة لعدد من حالات أورام الخلايا الكبدية مما يدل على وجود عديد من مراحل تقدم الورم فى الخلايا الكبدية وأن مثل هذه الخلايا يتراكم بها الطفرات بمرور الوقت إذا تعرضت عمليات اصلاح الـDNA للخطر.

السرطان التلقائى Spontaneous Cancer

يبدأ تكوين الورم السرطانى عن طريق عديد من الطفرات المتنوعة. وكما ذكرنا سابقاً فإن ٩٠% من الأورام السرطانية التى تحدث تكون نتيجة لحدوث الطفرات التلقائية العشوائية وتشارك هذه

الطفرات جميعها فى انها تعرقل تنظيم دورة الخلية او الموت الخلوى والذى يؤدى إلى تكوين الهيربلزيا.

ويوجد قسمين من البروتينات الطافرة التى تسبب الورم السرطانى. فالطفرات التى تحدث فى البروتواونكوجينات ينتج عنها تكوين الجينات المسرطنة (Oncogenes) والذى ينتج البروتين الطافر والذى يحفز تكوين الورم السرطانى. ومن ناحية أخرى فإن الطفرات التى تحدث فى الجينات المكبته للورم (Tumor-suppressor genes) تنتج البروتينات التى تسبب كبت الموت الخلوى (Apoptosis) أو حدوث الانقسام الخلوى بطريقة غير منظمة اثناء الانقسام الخلوى.

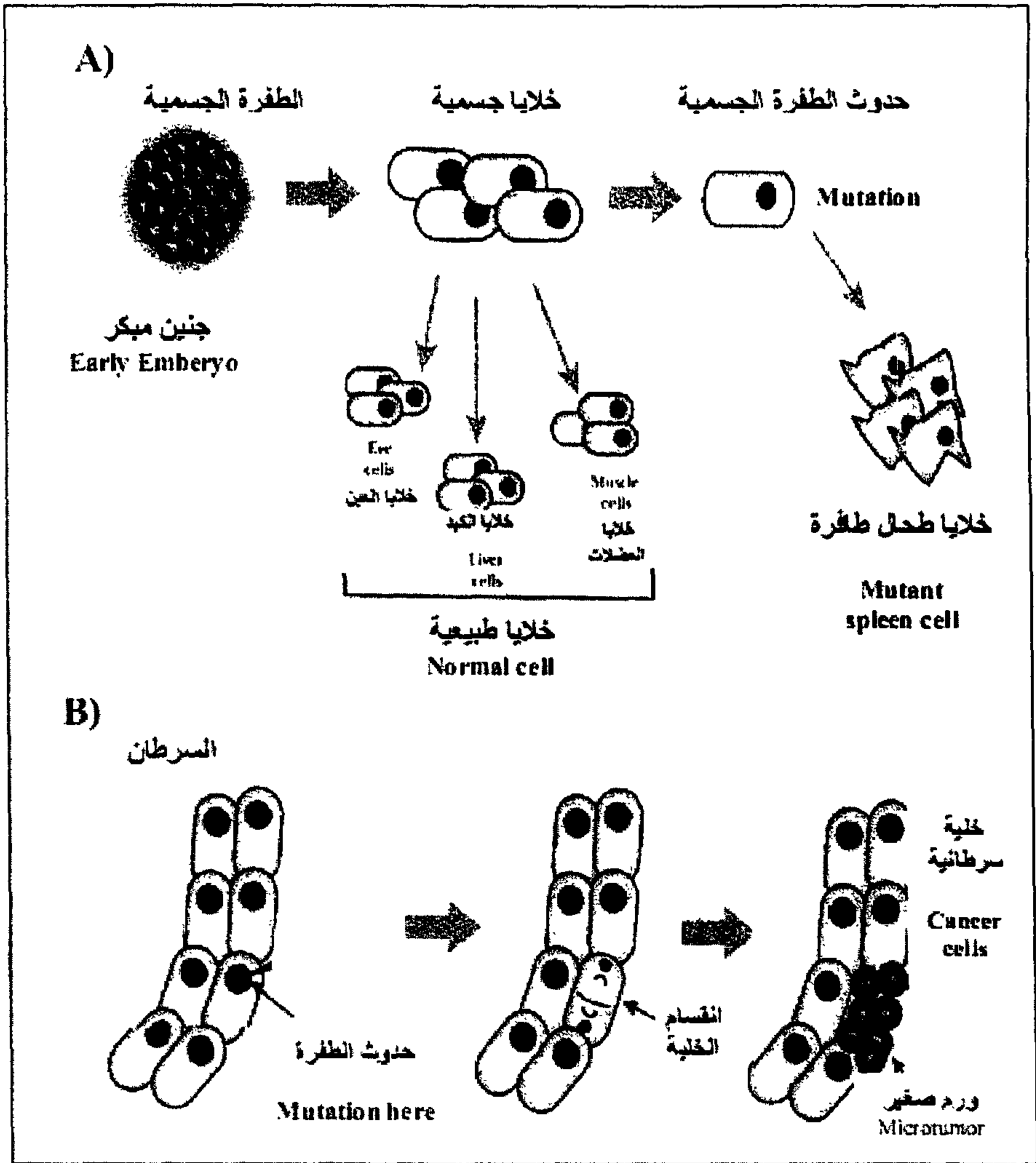
Cancer is Genetic Origin

المنشأ الوراثى للسرطان

من الواضح أن كلاً من الأمراض الوراثية والسرطان لهما منشأ وراثى. فالأمراض الوراثية هى نتيجة لفشل وراثى يورث إلى النسل عن طريق الخلايا التناسلية (Germline) نظراً لحدوث الطفرة التى تسبب المرض الوراثى فى الخلايا التناسلية. وعلى العكس من ذلك يكون

السرطان (Cancer) محدداً بفرد واحد وأنه لا يورث إلى النسل حيث ينشأ السرطان نتيجة لحدوث طفرة فى خلية جسمية (Somatic cell) والتى ينشأ منها باقى أجزاء جسم الكائن وتوجد عديد من الاحتمالات لحدوث الطفرة الجسمية:

- ١- قد تحدث الطفرة الجسمية فى مرحلة النمو الجنينى المبكرة وبالتالى سوف يكون لها تأثير ضار وربما تأثير مميت عندما تؤدى هذه الطفرة إلى فقد وظيفة أحد أعضاء الجسم الهامة (شكل ٩٨).
- ٢- قد تحدث الطفرة فى مرحلة النمو الجنينى المتأخرة وينحصر تأثيرها فى خلية واحدة أو عدد قليل من الخلايا وبذلك يصبح تأثيرها أقل معنوية.
- ٣- قد تحدث الطفرة فى مرحلة نضج الكائن (Adult) ويظل تأثيرها أيضاً خطيراً بالنسبة للكائن. فقد تحدث الطفرة فى خلية جسمية متشكلة ومتوقفة عن الانقسام وتدفعها مرة أخرى للانقسام الخلوى وتكوين الورم الصغير (شكل ٩٨).



شكل (٩٨): الطفرات الجسمية (Somatic mutations)

A. جنين مبكر يحتوي على الخلايا التي سوف تتشكل لتعطي أنسجة الجسم المختلفة وحدث الطفرة الجسمية في الخلية التي ستتقسم لتعطي نسيج الطحال مما يترتب عليه تكوين خلايا طحال طافرة.

B. حدوث السرطان نتيجة حدوث طفرة جسمية في خلية جسمية متشكلة ومتوقفة عن الانقسام تدفعها للانقسام مرة أخرى وتكوين الورم السرطاني الصغير (Microtumor).

وفى الحقيقة ينشأ السرطان نتيجة لحدوث طفرات جسمية تسبب ضرراً فى نظام التحكم فى الانقسام الخلوى للخلايا وغالباً ما يبدأ السرطان بخلية مفردة متشكلة ومتوقفة عن الانقسام الخلوى لفترة طويلة لتبدأ مرة أخرى فى الانقسام الخلوى المتتالى. ويمر السرطان بعدد من المراحل تحتاج إلى عدد من الطفرات الجسمية والتي ينتج عنها ما يلى:

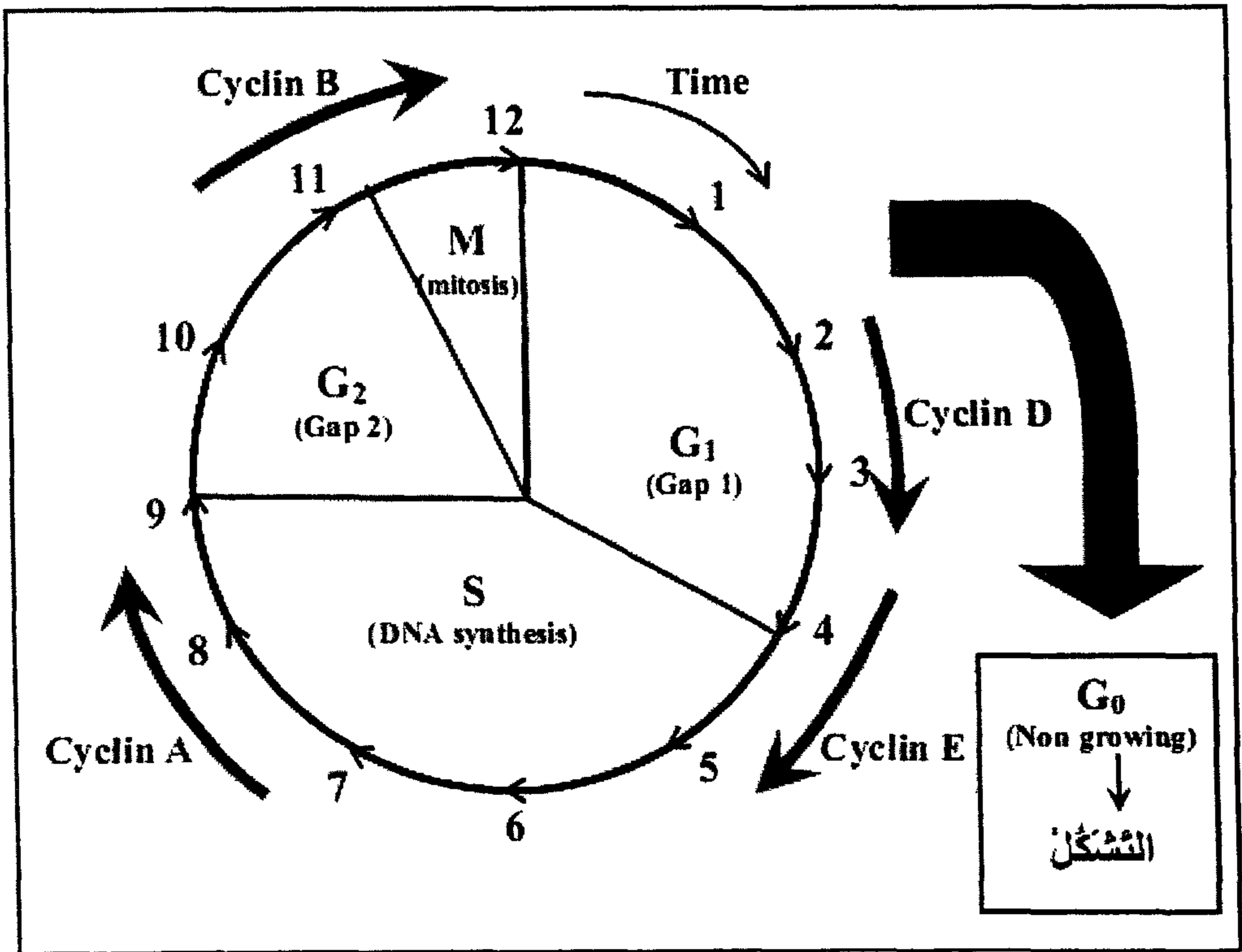
١. فقد الخلية لمقدرتها على التحكم الطبيعى فى الانقسام الخلوى.
٢. تنقسم الخلية الطافرة انقسامات خلوية متتالية مكونة ورم صغير (Microtumor) ومع ذلك يتم تحطيم معظم هذه الأورام الصغيرة بواسطة النظام المناعى بينما يظل البعض الآخر ساكن لعدد من الأشهر أو عدد من السنين حيث يحتوى هذا الورم الاولى (الهيبربلزيا) على ما يقرب من مليون خلية ساكنة لفقدانها وسيلة الحصول على غذائها.
٣. إذا حدثت طفرات جسمية أخرى فى خلايا الورم الاولى يبدأ المنال من الأوعية الدموية حيث تصدر الخلايا السرطانية إشارات جزيئية إلى الأنسجة المحيطة بالعملية المعروفة باسم انجيوجنيسس (Angiogenesis). وبمجرد أن يحصل الورم الاولى على احتياجاته من الدم يستمر فى النمو ليصل إلى الحجم الكبير ويمكن استئصال الورم فى هذه المرحلة بعملية جراحية إذا كان الورم الكبير محدداً بأحد الأماكن بالجسم ويعرف فى هذه الحالة بالورم الحميد.
٤. إذا حدثت طفرات أخرى فى خلايا الورم الصغير يكتسب بذلك القدرة على مهاجمة أنسجة أخرى وتكوين أورام ثانوية فى أماكن متعددة من الجسم ويسمى فى هذه الحالة بالورم الخبيث أو ما يعرف بالميتاستاسيس (Metastasis). والسرطان الذى يحدث له انتشار يصعب أو يستحيل علاجه.

الانقسام الخلوى الطبيعى (دورة الخلية)

The normal cell division (The cell cycle)

مما لا شك فيه أنه لى نفهم كيف يحدث السرطان يجب الإلمام بالخطوات التفصيلية للانقسام الخلوى. ففى الكائنات حقيقية النواة تحتوى دورة الخلية على أربعة مراحل هى (شكل ٩٩):

- ١- مرحلة الـ G_1 phase ويحدث فيها نمو الخلية والاستعداد للانقسام الخلوى.
- ٢- مرحلة الـ S phase ويحدث فيها تضاعف الـ DNA وبالتالي تضاعف الكروموسومات.
- ٣- مرحلة الـ G_2 phase يستمر فيها نمو الخلية واستمرار الاستعداد للانقسام الخلوى.
- ٤- مرحلة الانقسام الميتوزى M (Mitosis) phase وفيها يتم انقسام النواة والخلية وتكوين خليتين جديدتين.

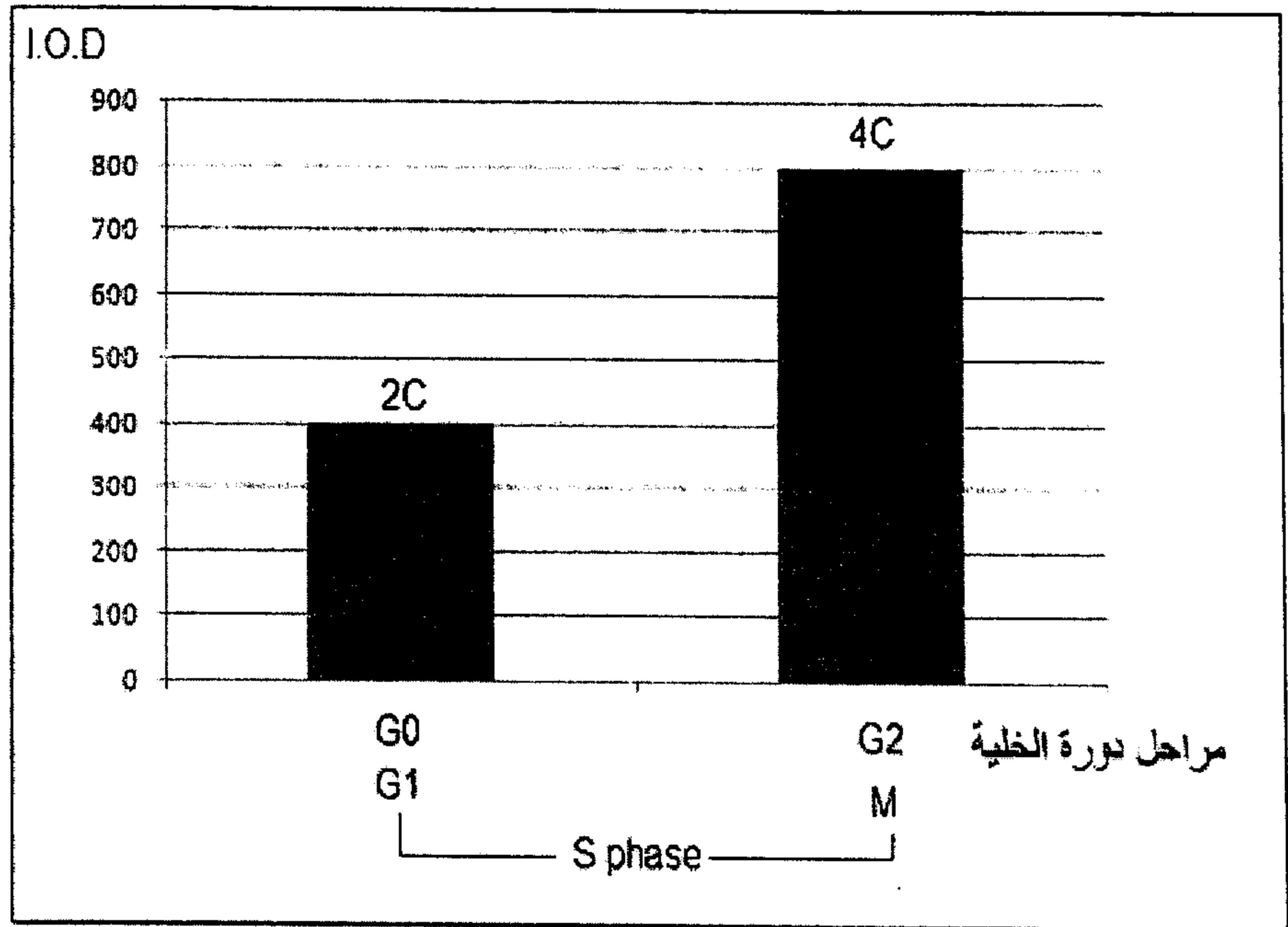


شكل (٩٩): دورة الخلية فى الكائنات حقيقية النواة (Cell Cycle Phases In Eukaryotic Cell) والتي تضم المراحل الأربعة G_1 و S و G_2 و M وبعد إنتهاء دورة الخلية قد تتوقف الخلية عن الانقسام وتدخل مرحلة G_0 لتتشكل (Differentiation) الخلية لتكوين نسيج معين يقوم بوظيفة محددة.

وأثناء دورة الخلية الطبيعية فلكي تنتقل الخلية من مرحلة لأخرى تحتاج إلى إذن من بروتين السيكلين (Cyclin) والذي يقوم بدوره في التحقق من استكمال أى مرحلة من مراحل دورة الخلية قبل دخول الخلية المرحلة التالية. ويوجد أربعة طرز من بروتين السيكلين هي سيكلين A و B و D و E ودور كل منهما في دورة الخلية على النحو التالي:

ويمكن تقدير كمية الـDNA فى المراحل المختلفة من دورة الخلية بطريقة غير مباشرة والمعروفة بالطريقة السيٲوفوتومترية (Cytophotometry) وذلك فى عشيرة من الخلايا التى تنقسم ميتوزياً أو النشطة فى الانقسام الخلوى حيث تعتمد هذه الطريقة على تقدير كمية الـDNA مقدرة بوحدات كثافة ضوئية (Integrated Optical Density (I.O.D.) فى المراحل المختلفة من دورة الخلية وعمل رسم بيانى لكمية الـDNA فى هذه المراحل المختلفة (شكل ١٠٠). ويلاحظ من هذا الرسم البيانى وجود قمتين لكمية الـDNA أحدهما تمثل كمية الـDNA فى الخلايا التى فى مرحلة الـG₀ ومرحلة الـG₁ بينما تمثل القمة الأخرى كمية الـDNA فى الخلايا التى فى مرحلة الـG₂ ومرحلة الـM وتقع الخلايا التى فى مرحلة الـS phase بينهما.

وتقدر كمية الـDNA بقيمة تعرف باسم C-value وهى كمية الـDNA فى الخلية الأحادية وعلى ذلك تكون هذه القيمة بمقدار 2C فى الخلايا الثنائية وهذا يفسر وجود قمتين لقيمة الـDNA فى الرسم البيانى السابق. حيث تمثل القمة الأولى الخلايا التى فى مرحلة الـG₀ ومرحلة الـG₁ والتى تحتوى على كمية من الـDNA مقدارها 2C والقمة الثانية تمثل الخلايا التى فى مرحلة الـG₂ ومرحلة الـM حيث تحتوى الخلايا على كمية من الـDNA تقدر بقيمة 4C وبعد إنتهاء الانقسام الخلوى تتكون خليتين جديدتين كل منهما تحتوى على كمية من الـDNA مقدارها 2C مرة أخرى.



شكل (١٠٠): منحنى لكمية الـDNA مقدره بوحدات كثافة ضوئية (I.O.D.) Integrated optical density فى المراحل المختلفة من دورة الخلية (Cell cycle phases) فى عشيرة من الخلايا التى تنقسم ميتوزياً mitosis ويلاحظ أن الخلايا التى فى مرحلة الـG₀ والـG₁ تحتوى على كمية من الـDNA مقدارها 2C بينما الخلايا التى فى مرحلة الـG₂ والـM تحتوى على كمية مقدارها 4C وأن مرحلة الـS-phase تقع بينها .

الجينات التي تسبب السرطان Genes that cause cancer

على الرغم من وجود بعض الجينات في التركيب الجيني (Genotype) تؤثر على القابلية للإصابة بالسرطان والتي تورث إلى النسل مثل أى مرض وراثى آخر إلا أنه يوجد قسمين رئيسين من الجينات التي تؤثر بطريقة مباشرة على حدوث السرطان هما:

١- البروتوونكوجينات: Proto-oncogenes

اكتشف البروتوونكوجينات لأول مرة في الفيروسات التي تسبب السرطان ثم اكتشفت بعد ذلك هذه الجينات في كل الخلايا الحيوانية وتنظم البروتوونكوجينات عملية الانقسام الخلوى فى الكائنات متعددة الخلايا والذي يحدث تحت نظام من التحكم الدقيق والذي يقوم به البروتوونكوجينات حيث تستمر الخلايا فى النمو والانقسام الخلوى فى الأنسجة المختلفة من الجسم إلى أن يصل النسيج إلى حجمه الطبيعى والصحيح ثم يتوقف بعد ذلك استمرار الانقسام الخلوى.

وإذا حدثت طفرات فى البروتوونكوجينات يترتب عليها حدوث النمو السرطانى وعلى ذلك فإن هذه الجينات ليست مسرطنة بذاتها مالم يحدث بها طفرات وإذا حدثت طفرة فى أحد نسخى البروتوونكوجين (Proto-oncogene) يصبح هذا الجين الطافر مسرطن ويسمى بالاونكوجين (Oncogene). والطفرات التى تحدث فى البروتوونكوجينات سائدة فى تأثيرها ومن ثم فإن حدوث طفرة فى أحد نسخى البروتوونكوجين تعتبر كافية لحدوث النمو السرطانى وذلك لأن الأليل الطبيعى الآخر لنفس الجين لا يستطيع تعويض هذا الفشل الذى نتج عن حدوث الطفرة. ويصبح هذا الجين الطافر جين مسرطن (Oncogene) يجعل الخلية غير قادرة على التحكم فى الانقسام الخلوى المتتالى مكونة فى النهاية الورم السرطانى Tumor. وتحتوى جينومات (Genomes) الفيروسات المختلفة على البروتوونكوجينات والتي تطفر إلى الجينات المسرطنة (Oncogenes) بحدوث الطفرات فيها وذلك لأن الفيروسات حصلت على البروتوونكوجينات أساساً من جينومات الخلايا العائلة التى تهاجمها وتلتقط بعض طرز الفيروسات أحياناً بعض الـ DNA الخلوى للخلية العائلة وتدمجه فى الجينوم الفيروسي وقد يحدث أحياناً أن تلتقط هذه الفيروسات البروتوونكوجينات وتدمجه فى جينومها وبالتالي

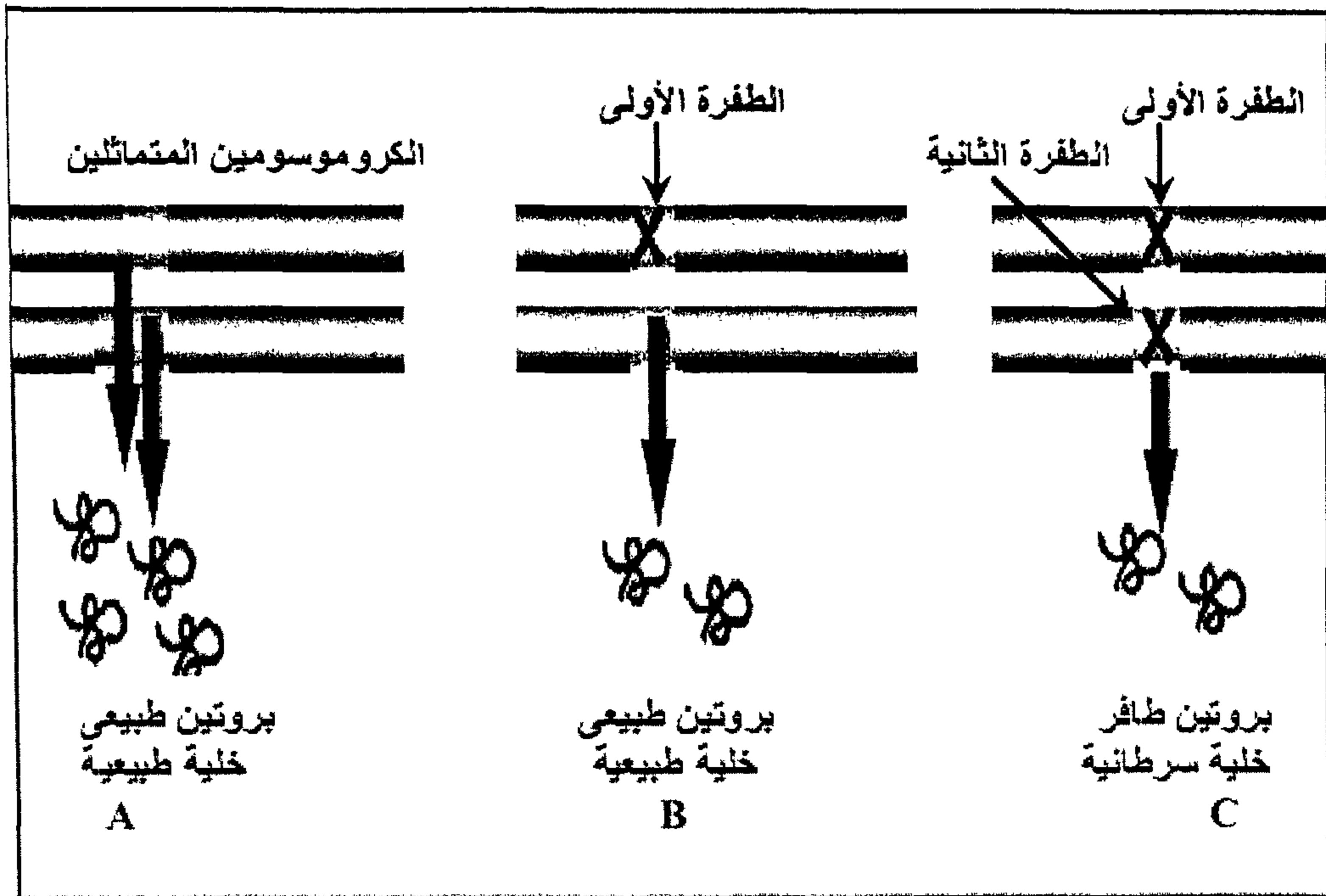
يصبح الفيروس حاملاً للجينات التى تطفر وتصبح فيروسات مسرطنة وعلى الرغم من وجود عدد قليل من الفيروسات المسببة للسرطان إلا أن معظم حالات السرطان المختلفة التى تحدث فى الإنسان ترجع إلى حدوث الطفرات فى البروتواونكو جينات وتحولها إلى جينات مسرطنة .

٢- الجينات المضادة للسرطان أو الجينات المكبتة للورم

Anti-oncogenes or tumor suppressor genes

الجينات المضادة للسرطان أو الجينات المكبتة للسرطان لها تأثير سالب على الورم السرطانى حيث أنها تكبت (Repress) الاستمرار الخلوى للخلايا السرطانية ولكنها قد تتحول إلى جينات مسرطنة إذا حدثت بها طفرات فى كلا نسختى الجين المضاد للسرطان (Anti-oncogene) حيث أن الطفرة فى نسخه واحد من الجين المضاد للسرطان عديمة التأثير بمعنى أنها طفرات متنحية (Recessive) وإذا حدثت الطفرة فى كلا نسختى الجين المضاد للسرطان تسمى هذه الحالة باسم (Nullizygous) . ومن الجينات المضادة للسرطان الأكثر شيوعاً فى الإنسان الجين (Rb1) والجين p53 حيث أن معظم الأورام السرطانية فى الإنسان يحدث لها كبت باى من الجينين السابقين أو كلاهما . وتوجد طريقتين لكى تصبح كلا نسختى الجين المضاد للسرطان غير فعالة وظيفياً بمعنى أنها تصبح غير قادرة على كبت الورم السرطانى هما:

١- الطريقة الأولى: وفى هذه الطريقة يحدث طفرتين جسيميتين أثناء الانقسام الخلوى للخلايا التى يتكون منها جسم الكائن حيث تحدث الطفرة الأولى فى أحد نسختى الجين المضاد للسرطان وتحدث الطفرة الثانية فى النسخة الثانية لنفس الجين المضاد للسرطان وبالتالي يصبح ناتج التعبير الجينى لكلا الطفرتين بروتين غير فعال وظيفياً فى كبت (Repression) الورم السرطانى أو عدم تكوين هذا البروتين الكابت للورم السرطانى ومن ثم تتحول هذه الخلية الجسمية إلى خلية سرطانية Cancer cell (شكل ١٠١).



شكل (١٠١) تأثير الطفرات التى تحدث فى الجينات المضادة للسرطان (Anti-oncogenes)

A. كلا نسختى الجين المضاد للسرطان طبيعية ويحدث تعبير جينى لها ويتكون بروتين طبيعى وبذلك تكون الخلية طبيعية.

B. حدوث الطفرة الأولى فى نسخة واحدة من نسختى الجين المضاد للسرطان ونظراً لأن النسخة الأخرى طبيعية فسوف يحدث تعبير جينى لها ويتكون بروتين طبيعى وتكون الخلية طبيعية.

C. حدوث الطفرة الثانية فى النسخة الثانية لنفس الجين المضاد للسرطان وبذلك لا يتكون أى بروتين وتصبح الخلية خلية سرطانية.

٢- الطريقة الثانية: وهى الأكثر شيوعاً وأكثرها حدوثاً وتكرار حيث تحدث الطفرة الأولى فى أحد نسختى الجين المضاد للسرطان (Anti-oncogene) فى الخلايا التناسلية وبالتالي تورث هذه الطفرة إلى النسل وبذلك سوف يبدأ الفرد المولود حياته بوجود نسخة طافره من الجين المضاد للسرطان غير فعالة وظيفياً بمعنى فقدانها القدرة على إنتاج البروتين الكابت للورم السرطانى أو كبت الانقسام الخلوى

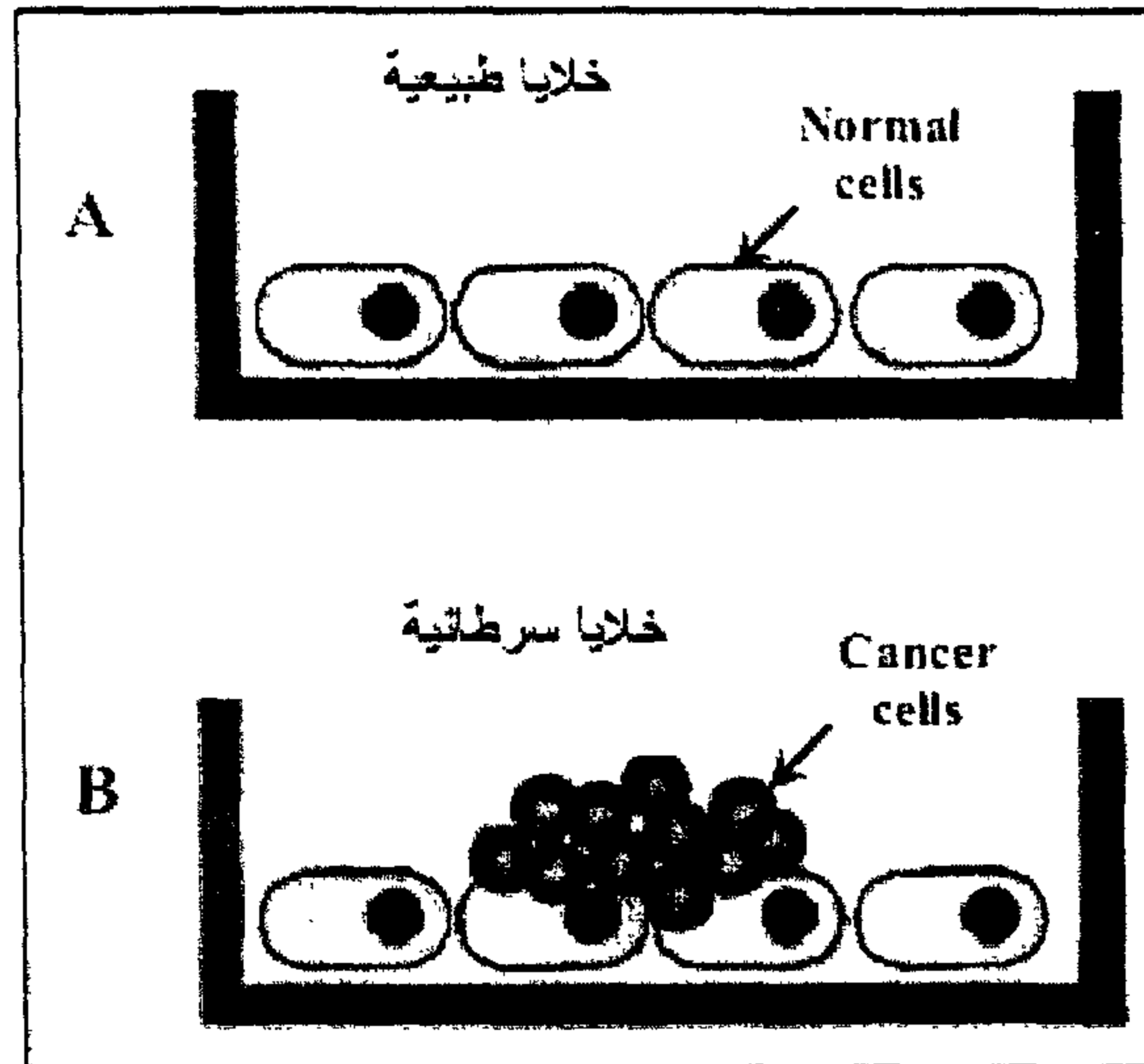
وإذا تصادف وحدثت الطفرة الثانية فى النسخة الثانية لنفس الجين المضاد للسرطان فسوف تصبح كلا نسختى الجين غير فعالة وظيفياً فى كبت الانقسام الخلوى وبالتالي تتحول الخلية من خلية طبيعية إلى خلية سرطانية وتنقسم انقسامات خلوية متتالية بدون تحكم فى الانقسام الخلوى مكونة الورم السرطانى.

اكتشاف الاونكوجينات بواسطة التحول الوراثى

Detection of oncogenes by genetic transformation

إذا أُستخلص الـDNA من الخلايا السرطانية وأدخل فى خلايا سليمة فسوف يحولها إلى خلايا سرطانية ويعرف هذا بالتحول السرطانى (Cancer transformation). وعلى ذلك إذا وجد اشتباه فى وجود جين مسرطن (Oncogene) فيمكن اختبار ذلك بإضافة عينة من الـDNA المشتبه فيه إلى مزرعة خلوية مناسبة.

فالنمو الطبيعى للخلايا الحيوانية فى مزرعة خلوية لزراعة الخلايا (Cell culture) عادة يحدث بانقسام الخلية الطبيعية بصورة مستمرة مكونة طبقة من الخلايا بسمك خلية واحدة فى جميع الجوانب من طبق الزرع (Culture-dish) ولا يحدث نمو وانقسام لهذه الخلايا لتكون طبقة من الخلايا فوق بعضها حيث أنه بمجرد أن يمتلأ السطح المتاح بالخلايا المتلاصقة من جميع الجوانب يتوقف الانقسام الخلوى وتعرف هذه الظاهرة بالتنشيط بالتلامس (Contact inhibition) كما هو مبين فى (شكل ١٠٢).



شكل (١٠٢): التثبيط بالتلامس (Contact inhibition) والذي يختفى في الخلايا السرطانية.

A. مزرعة خلوية (Cell culture) لخلايا طبيعية حيث تنقسم وتنمو الخلايا الطبيعية حتى تلامس بعضها من جميع الجوانب مكونة طبقة من الخلايا بسماك خلية واحدة وبمجرد أن يمتلأ السطح المتاح بالخلايا تتوقف الخلايا عن الانقسام والنمو .

B. إذا حدثت الطفرات في الجينات التي تؤثر على الانقسام الخلوي البروتوانوكوجينات فإن الخلايا تستمر في الانقسام الخلوي مكونة ورم صغير (Microtumor) في المزرعة الخلوية.

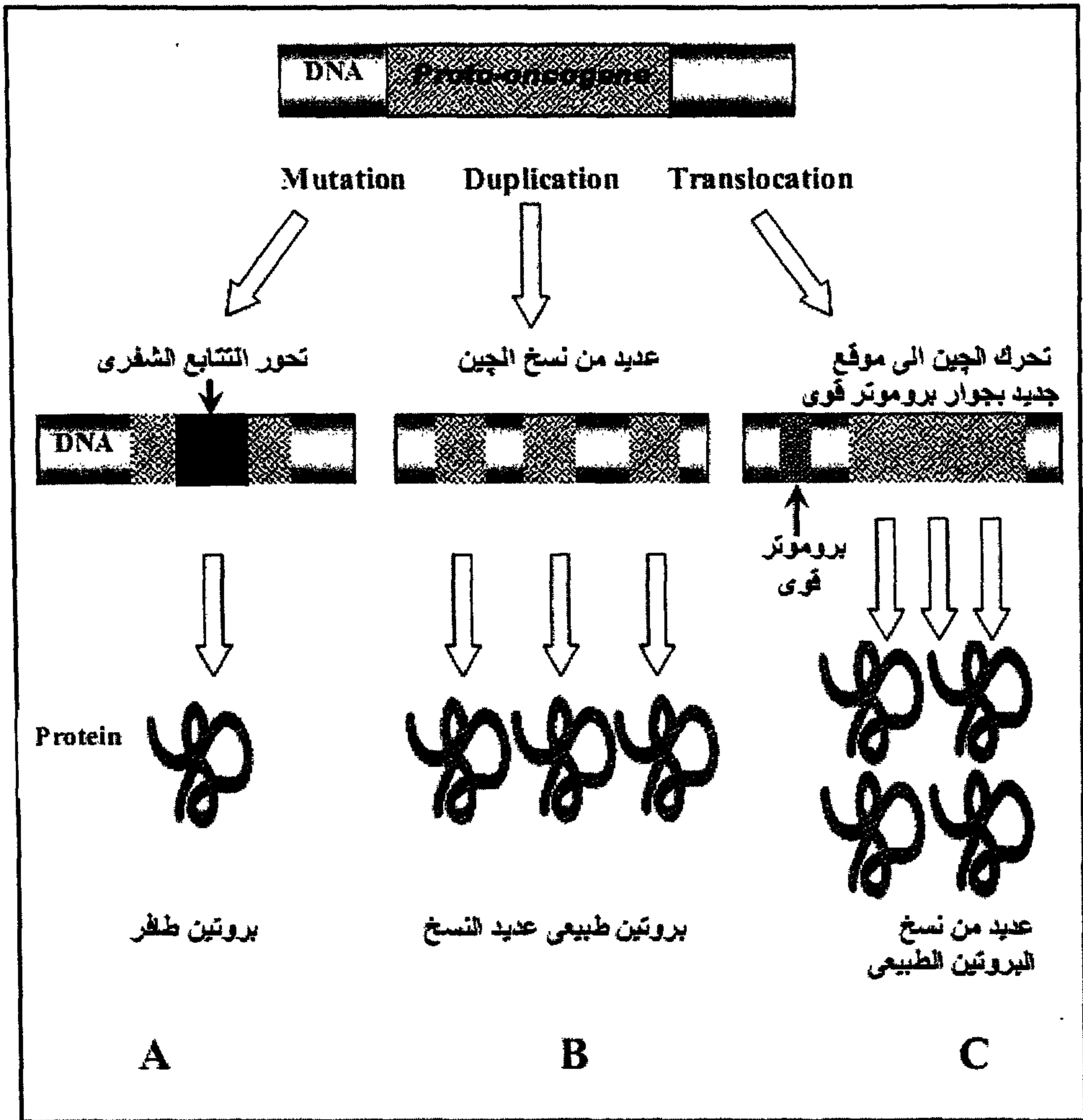
وعلى العكس من ذلك فنمو الخلايا السرطانية يستمر بالانقسام الخلوي المتتالي وتتجمع الخلايا فوق بعضها مكونة كومه (Heap) من الخلايا ولا يحدث تثبيط لانقسامها بتلامسها السطحي ببعضها (شكل ١٠٢) ويمكن مشاهدة هذا النمو السرطاني ورؤيته إذا كان الـ DNA المضاف إلى الخلايا الطبيعية يحتوى على جين مسرطن (Oncogene) حيث تظهر كومه الخلايا على صورة ورم صغير (Microtumor) وبأخذ خلايا من هذا الورم السرطاني وحقنها في حيوانات التجارب مثل الفئران (Mice) فسوف يتكون ورم حقيقى . ومن الخصائص الأخرى المرتبطة بالخلايا السرطانية هي قدرتها على الحركة والانتقال إلى مناطق أخرى متشكلة من الجسم وهذا السلوك يكون واضحاً وجلياً في الأورام السرطانية الخبيثة.

طرز الطفرات التى تولد الاونكوجينات

Types Of Mutation That Generate Oncogenes

الطفرات التى تحدث فى البروتواونكوجينات (Proto-oncogenes) لتوليد الجينات المسرطنة (Oncogenes) سائده فى تأثيرها ويوجد ثلاثة طرز من الطفرات التى تحدث فى البروتواونكوجينات لتصبح جينات مسرطنة هى (شكل ١٠٣):

- ١- طفرة تسبب حدوث تغير فى التتابع النيوكليوتيدى فى البروتواونكوجين يترتب عليه تغيير بعض الأحماض الأمينية فى البروتين الناتج ويصبح بروتين طافر غير قادر على التحكم فى تنظيم الانقسام الخلوى وتتحول الخلية إلى خلية سرطانية.
 - ٢- طفرة ناشئة عن تكرار البروتواونكوجين عديد من النسخ وبالتالي تنتج هذه الطفرة عديد من نسخ البروتين الطبيعى بكمية غير طبيعية.
 - ٣- طفرة ناشئة عن انتقال موقع البروتواونكوجين إلى موقع جديد بجوار بروتين قوى بسبب زيادة فى التعبير الجينى وبالتالي زيادة مستوى البروتين الناتج.
- وتشبه البروتواونكوجينات باقى الجينات الأخرى من حيث احتوائها على المنطقة التى تنظم تعبيرها الجينى بالإضافة إلى المنطقة التى تحمل شفرات البروتين. وبعض الجينات المسرطنة (Oncogenes) ترجع إلى حدوث طفرات فى المنطقة المنظمة والتى تؤدي إلى زيادة التعبير الجينى للبروتواونكوجين ويرجع البعض الآخر من الجينات المسرطنة إلى حدوث الطفرات فى المنطقة التى تحمل شفرات البروتين والتى تؤدي إلى إنتاج بروتين طافر فائق النشاط.



شكل (١٠٣): طرز الطفرات التي تحدث في البروتواونكوجين (Proto-oncogene):

- A. طفرة تحور التسابع الشفري تؤدي إلى إنتاج بروتين طفرى.
- B. الطفرة الناشئة عن تكرار عديد من نسخ البروتواونكوجين تؤدي إلى إنتاج بروتين طبيعي عديد النسخ بمستويات غير طبيعية.
- C. الطفرة الناشئة عن انتقال موقع البروتواونكوجين إلى موقع جديد بجوار بروتوموتور بسبب زيادة في التعبير الجيني وبالتالي زيادة مستوى البروتين الناتج.

تقدم الورم Tumor Progression

معظم البروتوونكوجينات (Proto-oncogenes) والجينات المكبته للورم (Tumor-suppressor genes) التى تم تحديدها حتى الآن تعمل على تثبيبه الانقسام الخلوى حيث ينتج عن الطفرات الأولية انقسام خلوى للخلايا غير متحكم فيه يعرف بالهيبربلزيا (Hyperplasia). وعلى الرغم من أنه مازال هناك مناقشات حول العدد الأدنى من الطفرات التى يحتاجها تقدم الورم الأولى إلا أن التحاليل الاحصائية أوضحت حدوث طفرتين فى البروتوونكوجينات لتكوين الجينات المسرطنة (Oncogenes) أو حدوث طفرتين فى الجينات المكبته للورم لتجعلها غير فعالة من حيث كبت الورم وهذا هو الحد الأدنى من الطفرات التى يحتاجها تقدم الورم. وبعد أن تثبه الطفرات الأولية تكوين الورم الأولى أو (الهيبربلزيا) فإنه يوجد عديد من الطفرات الإضافية التى تتطلبها عملية تكوين الورم الخبيث.

وفى الحقيقة فإن كل الجينات المسرطنة (Oncogenes) المتولدة نتيجة لحدوث الطفرات الأولية فى البروتوونكوجينات تسرع من دورة الخلية وحدث طفرات إضافية بعد ذلك يزيد من سرعة دورة الخلية. وعلى ذلك سوف يستمر تراكم الطفرات فى الخلايا التى تؤثر على تنظيم الانقسام الميتوزى وإصلاح الـDNA وكذلك الموت الخلوى. وحدث فقد لكلا نسختى الجين المكبت للورم يكون له نفس التأثير. ولقد أوضحت عديد من التحاليل على عديد من حالات السرطانات المتقدمة أنه على الرغم من أن الأورام تكتسب نفس الطفرات إلا أن مكان أو ترتيب هذه الطفرات التى تكتسبها على الـDNA ليس ثابت

الموت الخلوى Apoptosis

الموت الخلوى هو الممر الخلوى الذى يحتاج إلى تعبير بروتينات خلوية معينة تسبب فى النهاية موت الخلية وينقسم إلى عديد من المراحل هى:

- ١- مرحلة قبل التكثيف (Pre condensation stage) : وتمثل مرحلة بعد استقبال الخلية إشارة تحفيز موت الخلية وتسبق هذه المرحلة وجود علامات واضحة على الموت الخلوى. وأثناء هذه المرحلة يحدث تنشيط للإشارات الخلوية الداخلية التى تدفع الخلية للموت الخلوى. ويختلف طول هذه المرحلة من خلية لأخرى والذى يعكس عامل النمو البيئى وطبيعة إشارة الموت الخلوى.

٢- مرحلة التكثيف (Condensation stage): وفي هذه المرحلة يحدث تكثيف للسيتوبلازم يشمل فقد الخلية للارتباط والتفاعل بين الخلية التي سوف تموت والخلايا المجاورة وحدث نقص لحجم السيتوبلازم.

٣- مرحلة التكثيف النووي (Nuclear condensation stage) : وفي هذه المرحلة يحدث تكسير للـDNA ويعاد توزيعه على حافة المحيط النووي أو على حافة الغشاء النووي للنواة.

٤- مرحلة التجزئة (Fragmentation stage) : وفي هذه المرحلة يتم تجزئة أو تقسيم الخلية التي سوف تموت إلى عدد من الأجسام الميتة.

٥- مرحلة الفاجوسيتيك (Phagocytic stage) : وهي المرحلة النهائية في الموت الخلوي وفيها يبتلع بقايا الخلية الميتة بواسطة الخلايا المجاورة وينتج عن ذلك موت الخلية بدون مخلفات خلوية والتي تؤثر بصورة سلبية على الخلايا المجاورة.

Induction Of Apoptosis

استحداث الموت الخلوي

يبدأ الموت الخلوي بسبب فقد إشارة عامل النمو الخلوي أو بسبب ظهور اشارات الموت الخلوي الداخلية والخارجية. وتأتي عوامل الموت الخلوي الداخلية من داخل الخلية بينما تأتي عوامل الموت الخلوي الخارجية من خارج الخلية ولقد شوهد زيادة عدد الخلايا التي تنمو ببطيء في عدد من السرطانات مثل سرطان البروستاتا والذي يكون بسبب فشل تنشيط ممر الموت الخلوي الداخلي والذي ينظمه الميتوكوندريا. وتعمل الميتوكوندريا كمؤشر هام بالنسبة للصحة العامة للخلية ويحدث دفع لممر الموت الخلوي الداخلي عن طريق فقد إشارة عامل النمو الخارجي أو بزيادة الاجهاد الخلوي أو حدوث ضرر للـDNA.

وفي بداية الموت الخلوي يحدث فقد للطاقة الكهربائية الكامنة خلال غلاف الميتوكوندريا. ويحدث دفع الخلية لفقد الطاقة الكهربائية الكامنة عن طريق تكسير البروتين باكس (Bax) إلى البروتين تي باكس (T-Bax) والذي يدخل بدوره في الغلاف الخارجي للميتوكوندريا مكونا ثقبو تحرر السيوكروم C (Cytochrome C) من الميتوكوندريا. وفي سيتوبلازم الخلية يرتبط السيوكروم بالبروتين Procaspase-9 والبروتين Apaf-1 مكونا ابوبتوسوم (Apoptosome) مؤدياً ذلك إلى تنشيط البروتين Caspase-9. وهذا التنشيط في الابوبتوسوم يكسر المركب البادئ Procaspase-3 لإنتاج مركب Caspase-3 نشط والذي بدوره ينشط تجزئة الـDNA إلى قطع.

الباب الثالث عشر

التكاثر الكلوني فى الحيوانات

Clonal Reproduction in Animals

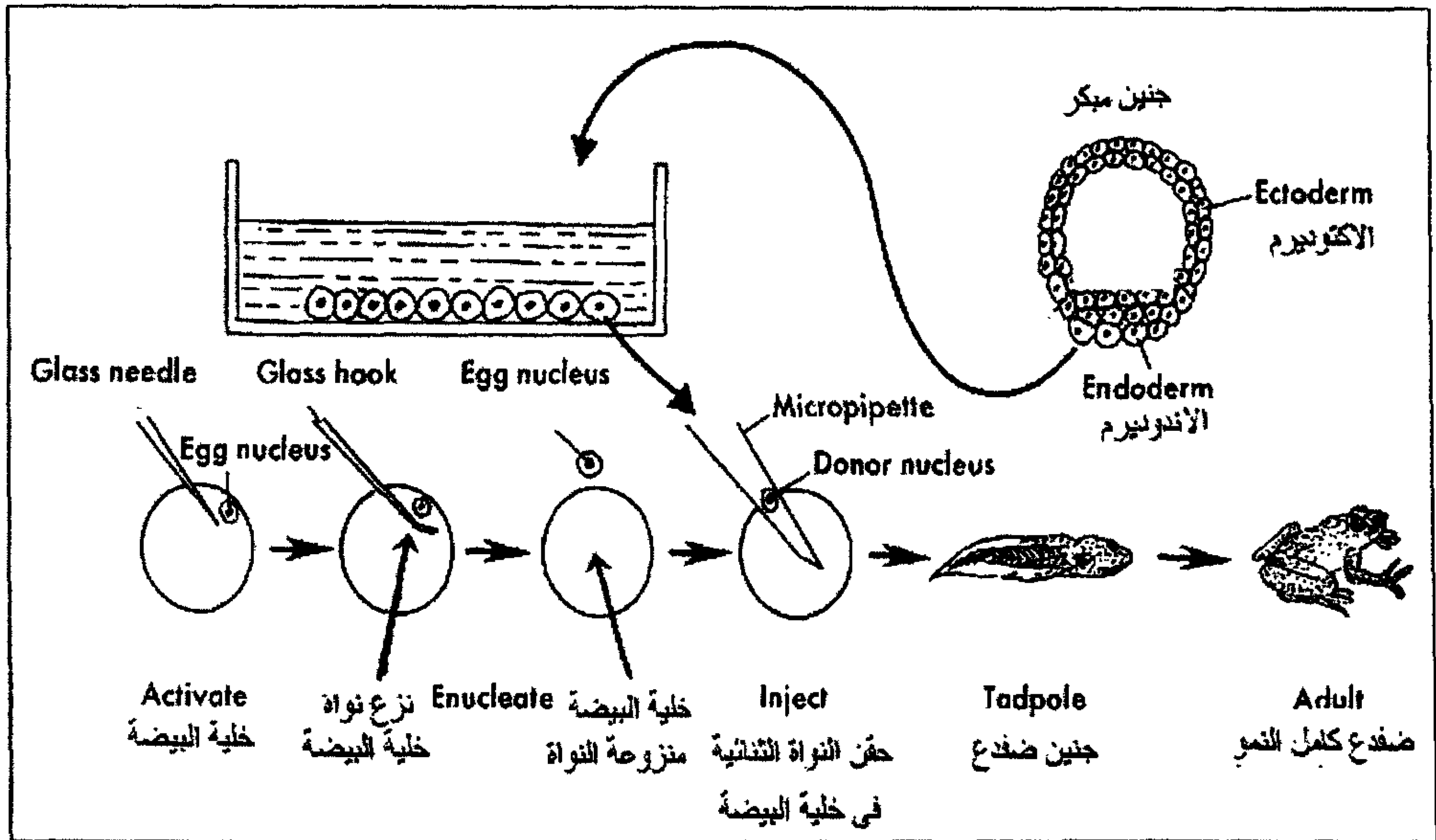
التكاثر الكلوني أو الاستنساخ هو وسيلة من وسائل التكاثر اللاجنسي (Asexual reproduction) فى الحيوانات والذي يجري بواسطة العلماء فى المعامل البحثية ولا يحدث فى الطبيعة.

ويمكن تعريف الكلون (Clone) بأنه مجموعة من الخلايا أو الأفراد المتماثلة والمتطابقة وراثياً والناجمة من خلية واحدة عن طريق الإنقسام الميتوزى المتتالى لتلك الخلية وما يعقبه من تشكل (Differentiation) ونمو إلى أنسجة وأعضاء حتى الوصول إلى الفرد الكامل النمو والتكوين. ويعتبر التكاثر الكلوني أو الإستنساخ فى المملكة الحيوانية مخالف لما هو مألوف وطبيعي من حيث حدوث التكاثر الجنسي (Sexual reproduction) عن طريق الإخصاب بين البويضات والحيوانات المنوية ويتطلب التكاثر الكلوني أو الاستنساخ معرفة نوعية وطبيعة الخلايا الحيوانية التى يمكن استخدامها فى التكاثر الكلوني أو الاستنساخ.

والسؤال الذي يطرح نفسه: هل تصلح جميع الخلايا فى الأعضاء المختلفة لحيوان ما لاستخدامها فى التكاثر الكلوني؟ وللأجابة على ذلك سوف نتناول الأبحاث والتجارب التى أجراها العالمين بريجز Briggs وكنج King عام ١٩٥٢ لدراسة طبيعة ونوعية الخلايا التى يمكن استخدامها فى التكاثر الكلوني حيث قاما بإجراء أبحاثهم على الحيوان البرمائي (Amphibian) *Rana pipiens* وتتلخص الطريقة التى اتبعاها فى الخطوات التالية (شكل ١٠٤).

وضع جزء من نسيج جنين فى مرحلة البلاستيولا (Plastula) أو فى مرحلة الجاستريولا (Gastrula) أو من برعم الذيل (Tail bud) فى محلول يسبب فصل الخلايا عن بعضها، ونظراً لأن كل خلايا الجنين نشأت من الأنقسام الميتوزي المتتالى لخلية البيضة المخصبة (الجنين) والثنائية (Diploid) فى العدد الكروموسومى (2n) فسوف تكون كل الخلايا الجسمية الموجودة فى تلك القطعة من النسيج المأخوذ متطابقة وراثياً من حيث التركيب الجيني (Genotype).

١. عزل البويضات غير المخصبة (Unfertilized eggs) من الإناث لتصبح خلايا مستقبلة (Recipient cells) وإزالة النوايا الأحادية (Haploid nuclei) من هذه البويضات غير المخصبة وبذلك تصبح خلية البيضة عديمة النواة.
٢. عزل الانوية ثنائية العدد الكروموسومي (2n) من الخلايا الجسمية (Somatic cell) من بعض أنسجة الجنين مع كمية صغيرة من السيروبلازم وحقنها فى خلية البيضة منزوعة النواة الأحادية وبذلك تصبح خلية البيضة ذات نواة ثنائية (Diploid).
٣. يجري تحفيز هذه الخلايا السابقة على الانقسام الميتوزى المتتالى مع ملاحظة ومشاهدة تكرار الأجنة التى تنمو بطريقة طبيعية وتلك التى تنمو بطريقة شاذة تؤدى إلى موت الأجنة.



شكل (١٠٤): يوضح مراحل الأستزراع النووى فى الضفدع

Nuclear Transplantation in *Rana pipiens*

- ١- أخذ قطعة خلوية من نسيج الأنوديرم وفصل خلاياها عن بعضها.
- ٢- نزع النواة الأحادية من خلية البيضة لتصبح خلية البيضة عديمة النواة.
- ٣- حقن النواة الثنائية المأخوذة من خلية الأنوديرم الجسمية.
- ٤- تكوين جنين ضفدع واستمرار نموه لينتج ضفدع كامل النمو والتكوين.

ولقد أوضحت نتائج التجارب التى أجراها العالمين بريجز Briggs وكنج King أنه فى معظم التجارب أو المحاولات التى أجريت وجد أن الأنوية (Nuclei) المأخوذة من خلايا طبقة الأندوديرم (Endoderm) من الأجنة التى فى مرحلة البلاستيولا والتى حقنت فى البويضات المنزوعة النواة أنتجت أجنة طبيعية تماماً مما يدل على أن خلايا طبقة الأندوديرم لم تتشكل بالدرجة التى تمنعها من الانقسام الخلوى مرة أخرى لتكوين أجنة طبيعية بينما الأنوية المأخوذة من خلايا طبقة الأندوديرم من الأجنة التى فى مرحلة الجاستريولا (Gastrula) وكذلك المراحل المتأخرة من نمو الجنين عندما حقنت فى خلايا بويضات منزوعة النواة الأحادية كانت نسبة كبيرة من الأجنة تنمو بطريقة شاذة وغير طبيعية وكذلك زيادة فى نسبة موت الأجنة عن تلك الناتجة من الأنوية المأخوذة من خلايا طبقة الأندوديرم من الأجنة التى كانت فى مراحل مبكرة من النمو كما هو مبين فى (جدول ٧). وتوضح هذه النتائج أن الأنوية المأخوذة من طبقة الأندوديرم (Endoderm) لأجنة كبيرة العمر أصبحت متشكلة (Differentiated) ولم تعد قادرة على أن تمد الجنين بالمعلومات الوراثية اللازمة لحدوث النمو الطبيعي وتكوين فرد كامل النمو كما تدل هذه النتائج على أن أنوية خلايا طبقة الأندوديرم أصبحت متشكلة وظيفياً لتنتج بروتينات خلايا الأندوديرم ومع ذلك يتضح جلياً أن أنوية الخلايا المتشكلة يمكنها أن تتحول عكسياً للقيام بوظيفة أخرى.

جدول (٧): النسبة المئوية للأجنة الشاذة الناتجة من حقن بويضات منزوعة النواة الأحادية بالأنوية الثنائية (Diploid nuclei) مأخوذة من خلايا جسيمة (Somatic cells) من أجنة الحيوان البرمائي *Rana pipiens* فى مراحل مختلفة من النمو الجنيني

النسبة المئوية للأنجنة الشاذة	مراحل النمو الجنيني
٢٣%	١- مرحلة الجاستريولا المبكرة (Early gastrula)
٨٠%	٢- مرحلة الجاستريولا المتأخرة (Late gastrula)
٩٦%	٣- برعم الذيل (Tail bud)

ولقد أجريت تجارب مماثلة باستخدام الضفدع الأفريقي *Xenopus laevis* ووجد أن الأنوية المأخوذة من خلايا جسمية (Somatic cells) لم يحدث لها تشكّل وتخصص وظيفي واضح عند حقنها فى خلايا بويضات منزوعة النواة الأحادية أنتجت أجنة طبيعية وكذلك ضفادع كاملة النمو

طبيعية بينما الأنوية المأخوذة من خلايا متشكلة ومتخصصة وظيفياً لم تتجح فى تكوين أجنة وتدل هذه النتائج بكل وضوح على أن أنوية الخلايا المتشكلة وظيفياً لا يمكنها العودة مرة أخرى لتصبح أنوية قادرة على الانقسام والنمو والتشكل مرة أخرى. كما أوضحت هذه النتائج فى ذلك الوقت الحاجة لمزيد من الأبحاث والدراسات على ظاهرة التشكل النووى (Nuclear differentiation) وخاصة دراسة تلك العوامل التى تؤثر على تحول أنوية الخلايا المتشكلة والمتخصصة وظيفياً إلى أنوية نشطة قادرة على الانقسام والنمو مرة أخرى وما يعقب ذلك النمو من تشكل وتخصص وظيفي.

وفى الخمسينات من القرن العشرين، كان العالم J.B. Caurdon أول من استخدم التكاثر الكلونى فى إنتاج ضفادع أفريقية للنوع *Xenopus laevis* وتتلخص الطريقة التى اتبعها فيما يلى:

- ١- عزل البويضات غير مخصبة (Non-fertilized eggs) من إناث الضفدع الأفريقي *Xenopus laevis*
- ٢- تحطيم الأنوية هذه البويضات الأحادية (Haploid nuclei) إما بالأشعاع فى بعض التجارب أو إزالة هذه الأنوية الأحادية من البويضات بجراحة دقيقة فى بعض التجارب الأخرى وبالتالي تصبح هذه البويضات (Eggs) عديمة الأنوية.
- ٣- استبدال نواة البيضة الأحادية بنواة ثنائية (Diploid nucleus) مأخوذة من خلايا أمعاء ضفادع صغيرة السن.
- ٤- تنمية خلايا البويضات المنزوعة الأنوية الأحادية والمستبدلة بأنوية ثنائية والمأخوذة من خلايا أمعاء ضفادع صغيرة السن على بيئة خاصة لزراعة الأنسجة (Tissue culture) وملاحظة ومشاهدة النمو الذى حدث، ووجد ما يلى:

أ- بدأت خلايا البويضات التى تحتوى على الأنوية الثنائية المكتسبة فى الانقسام الميتوزي المتتالى كما لو كانت هذه البويضات قد أخصبت.

ب- استمرار نمو هذه الخلايا (الجنين) عن طريق الانقسام الميتوزي المتتالى وما يعقبه من تشكل إلى أنسجة وأعضاء ومروراً بالأطوار الجنينية المختلفة إلى أن وصلت فى بعض الأحيان إلى ضفادع بالغة النمو والتكوين.

ولقد أوضحت نتائج التجارب الأخرى التي أجريت على التكاثر الكlonي (Clonal reproduction) أو الاستنساخ إمكانية استخدام أنوية (Nuclei) خلايا متشكلة (Differentiated) ومتخصصة وظيفياً بالإضافة إلى أنوية خلايا أمعاء الضفادع صغيرة السن في التكاثر الكlonي حيث تستطيع هذه الخلايا أن توهب (Donor) أنويتها الثنائية (Diploid nuclei) والتي تستخدم في حقن خلايا البويضات منزوعة النواة لإنتاج توائم من الضفادع المتطابقة وراثياً. وعلى ذلك فإنه ومن المتوقع حدوث التكاثر الكlonي (Clonal reproduction) في الحيوانات الراقية بما فيها الإنسان، حيث أنه أمكن حل معظم المشاكل الفنية المتعلقة باستخدام التكاثر الكlonي في الحيوانات.

ونظراً لأن المملكة النباتية تتميز بخاصية القدرة الكامنة (Totipotency) على التكاثر عن طريق زراعة الخلايا أو زراعة الأنسجة باستخدام خلايا متشكلة، فإنه يمكن استخدام هذه الطريقة من زراعة الخلايا والأنسجة النباتية لإنتاج نباتات متطابقة وراثياً ليس ذلك فقط بل أنه يمكن إنتاج مئات بل آلاف من النباتات المتطابقة وراثياً باستخدام قطعة صغيرة من النسيج النباتي ولكن هذه الطريقة ليست تكاثر كlonي والتي تتلخص في زرع أو حقن أنوية ثنائية (Diploid nuclei) مأخوذة من خلايا جسمية في خلايا بويضات منزوعة الأنوية.

التكاثر الكlonي في الثدييات Clonal Reproduction in Mammals

مما لا شك فيه أن التكاثر الكlonي في الثدييات أكثر تعقيداً منه في البرمائيات وذلك لأن النمو في الثدييات يحدث في داخل رحم أنثى الحيوان بينما يحدث النمو في البرمائيات في ماء جاري أو في طبق معمل. وأيضاً صعوبة الحصول على بويضات الثدييات واستمرارية نموها في أنبوبة التجارب (in vitro). كذلك تتطلب عملية استخلاص البويضات غير المخصبة واستبدال أنويتها الأحادية بأنوية ثنائية مأخوذة من خلايا جسمية مهارة كبيرة وأجهزة دقيقة جداً ومع ذلك حدث تقدم ملموس في التجارب التي أجريت على الثدييات مثل الفئران (Mice) ولقد استمرت الأبحاث والتجارب على التكاثر الكlonي أو الاستنساخ في الحيوانات الثديية بطريقة مكثفة حتى عام ١٩٩٦ حيث استطاع العالم البريطاني إيان ويلمات Ian Wilmut من النجاح في استنساخ (Cloning) النعجة دوللي (Dolly).

كلونة (استنساخ) النعجة دوللى Dolly, the cloned sheep

تتميز خلايا الجنين المبكر بالقدرة الكامنة (Totipotent) على الانقسام الخلوي لتصبح أى طراز من طرز الخلايا مثل الكبد والطحال والمخ وغيرها من الأعضاء الأخرى، بينما الجنين الذي فى المراحل المتأخرة من النمو، يفقد هذه القدرة الكامنة لأن خلاياه أصبحت متشكلة ومتخصصة لتصبح أنسجة معينة مثل النسيج العصبي أو النسيج الهضمي وغيرها من الأنسجة الأخرى.

ومعظم الخلايا فى الحيوانات البالغة (Adult) إما أنها لا تنقسم مرة أخرى أو أنها أصبحت تمثل طرز معينة من الخلايا تقوم بوظائف معينة. ويحدث التعبير الجيني للجينات المختلفة أثناء النمو تبعاً للوظيفة التى تقوم بها الخلايا فى الأنسجة المختلفة حيث يحدث التعبير الجيني لبعض الجينات فى نسيج ما ويكبح أو يكبت (Repress) فى الجينات الأخرى فى نفس النسيج ومع ذلك يرتبط التعبير الجيني للجينات بالوظيفة التى تقوم بها فى نسيج ما فضلاً عن أنه لا يحدث التعبير الجيني لكل الجينات فى كل الأنسجة المختلفة من الجسم فى الكائنات الراقية. وعلى الرغم من أن كل الخلايا فى الحيوانات تحتوى على الجينوم (DNA) الكامل، إلا أنه ليس لديها القدرة على إعادة نموها وانقسامها الخلوى مرة أخرى لتكوين أفراد جديدة. ولكن استنساخ (Cloning) النعجة دوللى (Dolly) عن طريق التكاثر الكلوني أوضح أن الخلايا المتشكلة لم تصل بعد إلى المرحلة التى يصعب فيها إعادة نموها وانقسامها مرة أخرى وأنه يمكن لمثل هذه الخلايا أن تبدأ فى النمو والانقسام الخلوى مرة أخرى. والوسيلة التى استخدمت فى كلونة أو استنساخ النعجة دوللى (Dolly) من الخلايا البالغة (Adult) هى تجويع المزرعة الخلوية المأخوذة من الحيوان الواهب وبالتالي يتوقف تضاعف الـ DNA والانقسام الخلوى وتدخل الخلية مرحلة السكون (G_0 phase) من دورة الخلية وليس معروفاً تماماً ما الذى يحدث للـ DNA عند تجويع الخلايا، ومع ذلك فإنه من المحتمل حدوث بعض التغيرات والتحورات للـ DNA تشمل إزالة مجاميع الميثايل (Demethylation) من الـ DNA وتحوله إلى الصورة الموجود عليها فى الخلية الجينية. فعندما يتم وضع النواة التى فى مرحلة الـ G_0 nucleus (G_0 nucleus) فى خلية بيضة (Egg cell) منزوعة النواة، فإن هذه الخلية تبدأ فى الانقسام الخلوى مرة أخرى

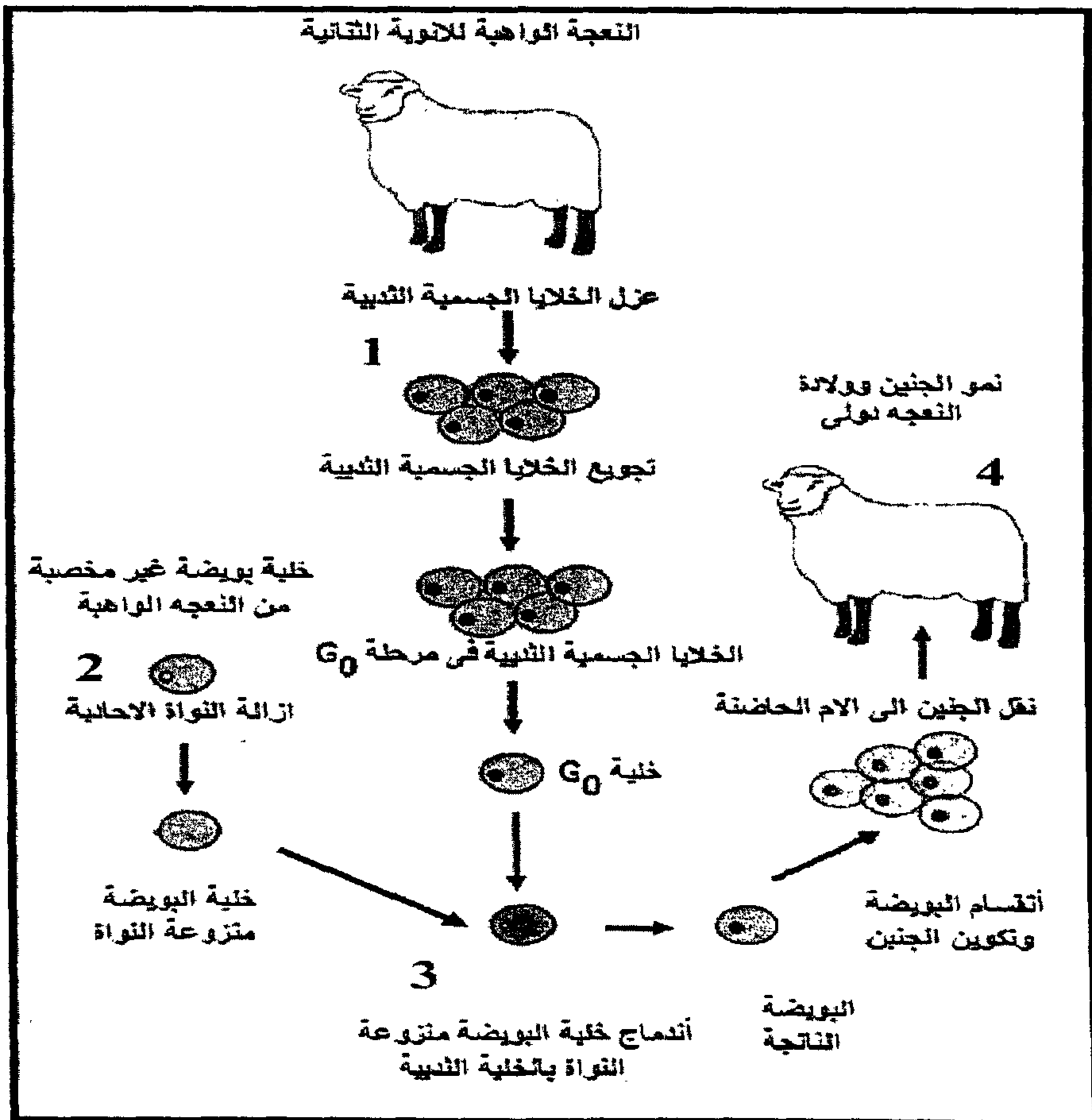
مكونة جنين والذي ينقل إلى رحم الأنثى الحاضنة، حيث يستمر نمو الجنين بطريقة جيدة ويولد حيوان كامل النمو الجنينى.

وفى عام ١٩٩٦ استطاع العالم البريطانى إيان ويلمات Ian Wilmat من استخدام طريقة التكاثر الكlonي أو الاستنساخ التى استخدمت فى استنساخ الضفادع لأستنساخ النعجة دوللى Dolly مع بعض التعديلات وتتلخص طريقة استنساخ النعجة دوللى فى الخطوات التالية (شكل ١٠٥):

١. استخدام نعجة من سلالة اسكتلندية بيضاء الجسم سوداء الوجه لتكون مصدر للبويضات الأحادية (Haploid eggs) التى تم عزلها وإزالة الأنوية الأحادية منها باستعمال أجهزة دقيقة لا تسبب أى ضرر بخلايا البويضات وبذلك تصبح خلايا البويضات عديمة النواة.
٢. استخدام نعجة فنلندية بيضاء الجسم والرأس لتكون مصدر للخلايا الجسيمة ذات الأنوية الثنائية (Diploid nuclei) والمتشكلة والمتخصصة وظيفياً بعزل خلايا ثديية (Mammary cells) من خلايا الضرع والتى تقوم بإفراز اللبن (وهذه النعجة كان عمرها ست سنوات)
٣. وضع الخلايا الثديية المأخوذة من ضرع النعجة الفنلندية على بيئة غذائية مناسبة مع خلايا البويضات منزوعة النواة الأحادية ودفعها للأندماج باستخدام صدمة كهربائية (Electric shock) ومعاملة الخلايا المندمجة بالطريقة التى تجعلها قادرة على النمو الطبيعى مرة أخرى من خلال الانقسام الخلوى المتتالى. وبعد مرور ستة أيام من النمو والانقسام أعيد زراعة كتلة الخلايا الناتجة فى رحم الأنثى الحاضنة (وهى نعجة اسكتلندية أخرى بيضاء الجسم سوداء الوجه) لتقوم كأم حاضنة لحمل الجنين فقط. بعد انقضاء فترة الحمل ومدتها ١٥٠ يوماً وضعت النعجة الأسكتلندية الحاضنة نعجة من نوع النعجة الفنلندية بيضاء الجسم بيضاء الوجه وسميت باسم دوللى (Dolly) والتى كانت نسخة وراثية مطابقة تماماً للنعجة الفنلندية التى أخذ من خلايا ضرعها النواة الثنائية (Diploid nucleus).

وعلى الرغم من نجاح هذا العالم فى استنساخ النعجة دوللى أو استخدام التكاثر الكlonي فى استنساخ النعجة دوللى، إلا أن فعالية أو كفاءة هذه الطريقة كانت منخفضة جداً حيث قام هذا العالم بإجراء ٢٧٧ تجربة لأندماج الخلايا إلا أن ثلاثة عشر (١٣) حالة فقط هى التى نجحت ونتج عنها حمل وتكوين جنين وأن حالة واحدة فقط من هذه الحالات الثلاثة عشر هى

- التي نجحت فى إتمام فترة الحمل بصورة طبيعية وهى التى أنتجت النعجة دوللى (Dolly) ويجب ملاحظة أن استنساخ أو كلونة النعجة دوللى اشترك فى إنتاجها ثلاثة إناث من النعاج هى:
١. الأنثى الواهة للبويضة أو خلية البويضة (Egg cell) منزوعة النواة الأحادية وهى النعجة الأسكتلندية ببيضاء الجسم سوداء الوجه.
 ٢. الأنثى الواهة لخلايا الضرع الثنائية وهى النعجة الفنلندية ببيضاء الجسم ببيضاء الوجه.
 ٣. الأنثى الحاضنة للجنين والتي قامت بعملية الحمل والولادة وهى نعجة اسكتلندية ببيضاء الجسم سوداء الوجه.



شكل (١٠٥): يوضح خطوات كلونة أو استنساخ النعجة دوللى (Cloning Dolly Sheep Steps)

شرح شكل (١٠٥)

- ١- أخذ خلايا جسمية من الضرع ووضعها في مزرعة خلوية ثم تجويع هذه الخلايا لتتوقف عن النمو والانقسام وتصبح في مرحلة السكون (G_0 phase).
- ٢- عزل خلية بيضة غير مخصبة وإزالة النواة الأحادية منها وبذلك تصبح خلية البيضة عديمة النواة.
- ٣- حدوث الاندماج للأغشية الخلوية بين خلية البيضة منزوعة النواة وخلية الضرع بواسطة صدمة كهربائية وينتج عن ذلك خلية بيضة تحتوي على نواة ثنائية والتي تنقسم انقسامات خلوية مكونة من مجموعة من الخلايا الجسمية الثنائية والتي يعاد وضعها في رحم الأم الحاضنة.
- ٤- ولادة الجنين ونموه بعد ذلك والحصول على النعجة دوللي كاملة التكوين والنمو.

والجدير بالذكر أن النعجة دوللي Dolly المستنسخة قد حملت ثلاث مرات بعد تلقيحها من كبش يدعي ديفيد David وأنجبت من الحمل الأول حمل واحد وفي الحمل الثاني أنجبت ثلاثة حملان وفي الحمل الثالث أنجبت حملان ورغم العناية الطبية الفائقة للنعجة دوللي Dolly التي كانت تتمتع بها منذ ولادتها في تمام الساعة الخامسة مساء ١٩٩٦/٧/٥، إلا أنها توفيت يوم ٢٠٠٣/٢/١٤ عن عمر ستة سنوات وسبعة أشهر وأحدى عشر يوماً وهو عمر صغير بالمقارنة بعمر الأغنام الطبيعي والذي يتراوح ما بين ١٢ إلى ١٦ عاماً.

ويعتبر أستنتساخ أو كلونة النعجة دوللي (Dolly) استنتساخ غير كامل أو كلونة غير كاملة وذلك لأنه بالإضافة إلى النواة (Nucleus) الممنوحة والمأخوذة من خلايا الضرع الثنائية والتي تحتوي على كل الجينات، فإن خلية البيضة (Egg cell) الحاضنة منزوعة النواة تحتوي على عدد قليل من الجينات الموجودة في الميتوكوندريا (Mitochondria) الموجودة بسيتوبلازم خلية البيضة الحاضنة ومن ثم فإستنتساخ النعجة دوللي كان بكلونة (Cloning) الـDNA فقط المأخوذ من خلية الضرع الثنائية بينما الـDNA الموجود بالميتوكوندريا كان موجوداً في سيتوبلازم خلية البيضة (Egg cell) الحاضنة منزوعة النواة.

ومنذ مولد النعجة دوللي المستنسخة، أمكن استنتساخ أو كلونة عديد من الحيوانات الأخرى بما فيها الماشية (Cattle) والخنازير (Pigs) والماعز (Goats) والفئران (Mice) والقطط (Cats) ويوضح (جدول ٨) الحيوانات التي تم استنتساخها أو كلونتها وتاريخ استنتساخها واسم الحيوان المستنسخ.

وقد نجح العالم الإيطالى Cesare Galli باستخدام طريقة العالم Ian Wilmat السابقة من استنساخ أو كلونة الحصان وإنتاج أول مهر مكلون أو مستنسخ والذي سمي باسم بروميتيا (Prometea) وقد أوضح هذا العالم أن نجاحه فى استنساخ الحصان سيكون له أثر إيجابي فى مجال التكاثر الكلوني لإكثار جياذ السباق الجيدة خاصة التى يتم خصيها على الرغم من صعوبة هذه الطريقة من التكاثر الكلوني، حيث أنه قد أجري ٣٢٨ محاولة من الاستنساخ أو الكلونة ونجح منها محاولة واحدة فقط والتى نتج عنها المهر بروميتيا.

جدول (٨): الحيوانات التى تم كلونتها أو استنسخها وتاريخ الاستنساخ وأسماءها المعروفة بها

Animal	Date	Name
Sheep	1996	Dolly
Mouse	1997	Cumilina
Cattle	1998	
Goat	1999	
Pig	2000	
Gaur	2000	Noah
Mouflon	2001	
Cat	2001	CopyCat
Rabbit	2002	
Banteng	2003	
Rat	2003	
Mule	2003	Idaho Gem
Horse	2003	
Deer	2003	
African Wildcat	2003-4	Ditteaux (male), Madge and Caty (Female)
Dog	2005	Snuppy

فوائد التكاثر الكلوني:

إن قدر الفوائد التى يمكن أن يقدمها التكاثر الكلوني أو الاستنساخ للبشرية يتعدى كل التصورات، وفيما يلي بعض الأمثلة للعديد من الفوائد الممكنة للاستنساخ (Cloning) لخدمة الإنسان وهى:

- ١- يمكن استخدام التكاثر الكlonي أو الاستتساخ لإكثار أنواع من الحيوانات التى تواجه خطر الانقراض وخاصة تلك التى تتكاثر جنسياً بمعدل منخفض بصورة طبيعية بالمقارنة بالمعدل المرتفع لموتها.
 - ٢- إكثار الأصول الوراثية من الحيوانات الإقتصادية كالأبقار والجاموس والجمال ذات الإنتاج المرتفع من اللحوم والألبان.
 - ٣- إكثار الحيوانات المعدلة جينياً (Transgenic animals) بطريقة سريعة ومنخفضة التكاليف نسبياً لإنتاج قطعان كبيرة من الحيوانات المتطابقة وراثياً.
- فلقد أجريت محاولات عديدة نجح بعضها فى إدخال بعض الجينات التى تنتج بعض البروتينات والهرمونات والإنزيمات الهامة فى جينومات (Genomes) بعض الحيوانات وأصبحت هذه الحيوانات المعدلة جينياً تقوم بإنتاج وإفراز هذه المواد الهامة فى ألبانها. ونظراً لأن إنتاج الحيوان المعدل جينياً والذي يحمل الجين المرغوب يكون مكلفاً فقد تصل التكلفة إلى عدة ملايين من الجنيهات وبالتالي يصبح من الضروري الحفاظ على هذا الحيوان المعدل جينياً عن طريق التكاثر الكlonي أو الاستتساخ وذلك لأن تكاثره بالطريقة الطبيعية (التكاثر الجنسي الطبيعي) قد تأخذ أعوام عديدة، بالإضافة إلى ما قد يحدث من إنعزال للجينات أثناء عملية التكاثر الجنسي الطبيعي والذي ربما قد يؤدي إلى فقد الجين المنقول (Transgene) فى النسل الناتج من التكاثر الجنسي الطبيعي.

تحسين الماشية عن طريقة هندسة الممرات الحيوية

Improving livestock by pathway engineering:

يحاول العلماء الآن الجمع بين طريقة التكاثر الكlonي وهندسة الممرات الحيوية لاستتساخ حيوانات محسنة وبالتالي يمكن استخدام الحيوانات المعدلة جينياً، كمصدر لإنتاج البروتينات والهرمونات المفيدة بطريقة اقتصادية، فعلى سبيل المثال، لا توجد الجينات اللازمة لإنتاج الإنزيمات التى لها دور فى الممر التخليقي الحيوي للحامض الأميني السيستين (Cystein) فى الثدييات وبالتالي فإنها لا تستطيع تخليق هذا الحامض الأميني ومن ثم فإنه يجب أن يقدم إلى الحيوانات الثديية فى طعامها أو فى غذائها. ولكن إضافة كميات إضافية من هذا الحامض

الأمينى إلى الغذاء يكون تأثيره ضعيف بسبب تكسيره بواسطة الكائنات الدقيقة الموجودة بأمعاء الحيوانات الثديية.

ويوجد عديد من الأنواع البكتيرية التى تستطيع تخليق الحامض الأمينى السيستين (Cystein) فى الممر الحيوي التالى على خطوتين عن طريق إنزيمين هما E1 و E2 :



ويحتوى جينوم البكتيريا على الجينين اللذان ينتجان هذين الإنزيمين وهما:

أ- الجين Cys K ويقوم هذا الجين بإنتاج إنزيم Serine transacetylase (E1) والذي يحفز الخطوة الأولى من الممر الحيوي.

ب- الجين Cys E ويقوم هذا الجين بإنتاج إنزيم Acetylserine sulfhydrylase (E2) الذي يحفز الخطوة الثانية من الممر الحيوي.

ولقد تم كلونة (Cloning) هذين الجينين (CysK, CysE) فى بلازميد بكتيري ووضعاً تحت تحكم بروجين (Promoter) معزول من الفئران (Mouse) والذي ينظم التعبير الجيني لجين Metallothionine فى الفئران وبذلك يصبح البلازميد المعاد توليفه Recombinant Plasmid (R.P.) محتوياً على:

١. الجين CysK والجين CysE

٢. بروجين جين المينالوثيونين المعزول من الفئران

٣. العناصر الأخرى الضرورية لتضاعف هذا البلازميد المعاد توليفه والسابق ذكرها.

ولقد تم كلونة الفئران بهذا البلازميد المعاد توليفه (R.P.) السابق فى جينوم الفئران (Mouse) وأمكن الحصول على فئران معدلة جينياً Transgenic mouse استطاعت أن تقوم بإنتاج هذين الإنزيمين السابق ذكرهما.

ومما يجدر الإشارة إليه أن بعض الطرق الأخرى العديدة التى تجري لتحسين الماشية من خلال إدخال جينات الممرات الحيوية الضرورية لتخليق بعض الأحماض الأمينية الأساسية،

مثل الحامض الأميني الليسين (Lysine) والثريونين (Therionine) مازالت في المراحل التجريبية الأولى.

مشاكل وأخلاقيات التكاثر الكlonي (الإستزراع النووي)

Problems and Ethics of Clonal Reproduction (Nuclear Transplantation)

الغرض من تكنولوجيا التكاثر الكlonي أو الاستنساخ (Cloning) الحصول على نسخ متطابقة وراثياً تماماً من حيوان ما. ويجب ملاحظة أن الحيوان المستنسخ يبدأ حياته بخلية مفردة والتي تنمو إلى جنين والذي يجب أن يواصل نموه خلال مرحلة الطفولة قبل أن يصل إلى الحيوان البالغ النمو (Adult).

والسؤال الذي يطرح نفسها وخاصة بعد استنساخ النعجة دولي (Dolly) هو: ماذا يحدث لو تم استنساخ الإنسان بطريقة التكاثر الكlonي؟ وفي الحقيقة أجريت مناقشات كثيرة حول استنساخ الإنسان وكان هناك كثير من النقد لاستنساخ الإنسان لأن ذلك يعتبر تهديد لقدسية حياة الإنسان على الرغم من أن استنساخ الإنسان موجود بالفعل في الطبيعة، المتمثل في التوائم المتطابقة (Identical twins) والتي هي نسخ متطابقة تماماً ناتجة عن تجزئة نفس البويضة المخصبة إلى جنينين مستقلين متطابقين وراثياً تماماً. ويعتبر عديد من العلماء القدامى التوائم المتطابقة في الإنسان هي أفراد خارقة للعادة في منشأها والبعض الآخر يعتبرهم توائم محظوظة ويعتبرهم بعض العلماء أيضاً أن كلا منهما مؤذي للآخر. وبغض النظر عن الاعتراضات الأخلاقية لاستنساخ الإنسان بواسطة التكاثر الكlonي، فإنه توجد مشكلتين كبيرتين تواجه استنساخ الإنسان من الناحية العملية هما:

١- أن عدد الأفراد المستنسخة المولودة تمثل نسبة ضئيلة جداً من المحاولات التي تجري من الإستزراع النووي (Nuclear Transplantation)، فالمحاولات التي أجريت على الحيوانات وجد أن عديد من الأجنة النامية تموت في مرحلة متأخرة من الحمل أو بعد الولادة مباشرة، كما وجد أن بعضها الآخر يحتوى على بعض الشذوذات وبالتالي فإن هذا الاستنساخ محفوف بكثير من المخاطر.

٢- فرصة نجاح الحمل في الأم الحاضنة في الإنسان يكون قليلاً جداً من فرصة نجاحه في حالة الأغنام وبالتالي فإن التكلفة المالية والمجهود المبذول لإنتاج نسخ من إنسان ما

تكون أكبر بكثير جداً من استنساخ الحيوانات، مثل الأغنام. وبغض النظر عن سيناريو الخيال العلمى، فإن سبب رغبة الإنسان فى استنساخ نفسه غير واضح. ونظراً لأن الوقت الذي يحتاجه نمو الإنسان طويل فإن ذلك يعنى أن استنساخ الإنسان لن يكون متاحاً لعدد من السنين المقبلة.

مشاكل النمو فى الحيوانات المكلونة أو المستنسخة

Development Problems in Cloned Animals

مازالت معظم محاولات استنساخ الحيوانات تواجه فشلاً كبيراً رغم معرفة المشاكل التكنولوجية التى تواجه هذا الاستنساخ أو الكلونة عن طريق الأستزراع النووى (Nuclear Transplantation) والذي يتضمن إعادة برمجة النواة (Nucleus) المأخوذة من الخلية المتشكلة والمتخصصة وظيفياً وهى عملية معقدة جداً ويحتمل أن المعدل المنخفض من النجاح فى استنساخ الحيوانات يرجع إلى الفشل فى إعادة برمجة النواة المستخدمة فى الأستزراع النووى كما ينبغى. ولقد أوضحت الأبحاث الحديثة أن عملية إضافة مجاميع الميثايل للـDNA هى العامل الرئيسى فى إعادة برمجة النواة المستخدمة فى الأستزراع النووى، حيث وجد أن هذه العملية (DNA methylation) فى الأجنة المستنسخة ليست مطابقة لمثيلاتها فى الأجنة الطبيعية وكذلك بالنسبة للحيوانات البالغة المستنسخة ومثيلاتها الطبيعية، ومع ذلك فإن النعجة دوللى (Dolly) المستنسخة وكذلك للحيوانات المستنسخة الأخرى انتجت نسلأ طبيعياً من الناحية الوراثية وبالتالي فإن الاستنساخ لم يسبب حدوث تحورات وراثية فى النسيج التناسلي للحيوان المستنسخ.

وعادة ما يسبب إضافة مجاميع الميثايل للـDNA غلق أو قفل التعبير الجيني لجينات الكائنات حقيقية النواة التى لا تكون هناك حاجة لتعبيرها الجيني فى أنسجة معينة أو فى مراحل معينة من النمو. وغالباً ما تنتج الحيوانات المستنسخة عدد كبير من النسل يحمل أعراضاً مظهرية معينة، حيث تكون أطرافها وأعضائها الداخلية من الجسم أكبر بصورة غير طبيعية وبالتالي فإن هذه الحيوانات أو هذا النسل الناتج من الحيوانات المستنسخة يكون ضعيف صحياً وهذه الأعراض ترتبط بالتعبير الخاطئ للجين (EGF2R)، حيث وجد أن هذا الجين حدث له تحول بإضافة مجاميع الميثايل وذلك فى الأجنة التى تحمل أعراضاً غير طبيعية.

الرئيسيات المعدلة جينياً Transgenic Primates

حتى الآن لم تتجح محاولات استنساخ الرئيسيات (Primates) والتي منها القروود والإنسان، ومع ذلك أمكن الحصول على قرد من فصيلة الريسيس (Rhesus) والمعدل جينياً (Transgenic Rhesus Monkey). فأول محاولة ناجحة لإنتاج رئيسيات معدلة جينياً كانت بمولد القرد أندى (Andi) وهو قرد من فصيلة الريسيس (Rhesus) يحمل الجين GFP وذلك فى نهاية عام ٢٠٠٠ ميلادية على النحو التالى:

- ١- استخدام الرتروفيروس (Retrovirus) كحامل (Vector) للجين GFP ونقله إلى الخلية العائلة.
- ٢- عزل بويضات غير مخصبة من القرد ريسيس (Rhesus).
- ٣- معاملة هذه البويضات غير المخصبة بالرتروفيروس الحامل للجين GFP فى أنبوبة الاختبار ثم إخصاب هذه البويضات بعد ذلك فى أنبوبة الاختبار أيضاً.
- ٤- أجريت ٢٢٤ محاولة من استخدام ٢٢٤ خلية بويضة (Egg cells) غير مخصبة ومعاملتها بالرتروفيروس الحامل للجين وأمكن الحصول على ٢٠ جنين فقط والتي تم نقلها إلى الأمهات الحاضنات. ونجح ٥ حالات حمل من بين الحالات التى أجريت للأمهات الحاضنات نتج عنها ثلاثة ذكور حية من القرد الريسيس (Rhesus) كان واحداً منهما فقط معدلاً جينياً (Transgenic rhesus) يحتوى على الجين (GFP) على الرغم من أن التعبير الجيني له كان بصورة منخفضة فى القرد الناتج والمعدل جينياً. ومما يجدر الإشارة إليه أن استنساخ القروود من فصيلة الريسيس (Rhesus) كان عن طريق تجزئة الجنين المكون من ثمانية خلايا إلى أربعة أجنة متطابقة وراثياً كل جنين كان يتكون من خليتين من الخلايا الثمانية والتي استخدمت فى استنساخ القرد الريسيس (Rhesus)، وعلى ذلك فإن هذه القروود المستنسخة هى توائم صناعية وليست ناتجة عن طريق الأستزراع النووي (Nuclear Transplantation) الحقيقي كما فى حالة استنساخ النعجة دوللى (Dolly) ولكن من الواضح أن القروود من فصيلة الريسيس (Rhesus) تم استنساخها بالطريقة السابقة.

ويبدو واضحاً أنه لا يوجد سبب من الناحية العلمية يمنع استنساخ القروود والإنسان عن طريق الأستزراع النووى ولكن من أهم الأهداف الممكنة الاستخدام الاستنساخ فى الإنسان هو

استنساخ الأنسجة (Tissue Transplantation) للحصول على أنسجة سليمة والتي تستخدم فى الأغراض الطبية العلاجية بدلاً من توليد أفراد من بنى الإنسان جديدة، وإعادة برمجة خلايا الإنسان وتتميتها فى مزارع الأنسجة للحصول على الأنسجة المرغوبة مثل نسيج كبد أو كلى أو غيرها يمكنه أن يقدم خدمة كبيرة للمرضى من بنى الإنسان بتليف الكبد أو الفشل الكلوى وهذا ما يعرف بالاستنساخ العلاجى (Therapeutic Cloning) والذي بدأ بالفعل يخطو بخطى سريعة.

المراجع References

- 1- Coldberg ,Ann E.Reynolds, Lee M.Silver and Ruth C.veres (2004). Genetics: From genes to genomes . Mc Graw-Hill Companies.Inc.
- 2- David P.Clark and Nanette J.Pazdernik (2004) . Biotechnology : Applying the genetic revolution . Elsevier . Inc.
- 3- Eldon John Garder , Michael J.Simmons and Peter D.Snustud (1991). Principles of Genetics . John Willey and Sons , Inc .
- 4- George W.Burns and Paul J.Bottino (1989). The Science of Genetics . Macmillan Publishing Company , a division of Macmillan , Inc .
- 5- Gupta P.K. (2004).Biotechnology and Gemonics . Rakeoh Kumar Rastogi For Rastogi Publications . INDIA .
- 6- Leon Snyder , David Freifelder and Daniel Harlel (1985) .General Genetics Jones and Bartlett Publishers . Inc., 30 Granda Court , Portola Valley , CA94025.
- 7- Peter D.Snustad and Michael J.Simmons (2006). Principles of Genetics. John Willey and Sons , Inc .
- 8- Robert J.Brooker (2005).Genetics: analysis and principles . Mc Graw-Hill Companies.Inc.
- 9- Swamy P.M. (2009).Laboratory manual on biotechnology. Rakeoh Kumar Rastogi For Rastogi Publications . INDIA .
- 10- William S.Klug , Michael R.Cummings and Charlotte A.Spencer (1983). Concepts of Genetics.C.E.Merrill Publishing Company.

المراجع العربية

منير السعيد محمد موسى ومحمد محمد عبد الفتاح ياقوت . ٢٠٠٤ . أساسيات علم الوراثة .
الشنهابى - الاسكندرية . مصر .

Glossary

مُسرد وشرح المصطلحات

A

Activate protein البروتين المنشط
هو البروتين الذى ينشط عمل الجين.

Ada gene الجين أدا
هو الجين الذى يحمل شفرات إنزيم أدينوزين دى أمينيز.

Adaptation التأقلم
أى خاصية أو صفة فى كائن ما تحسن فرصته فى الحياة والتكاثر فى بيئته.

Adenoviruses الأدينوفيروسات
عائلة صغيرة من الفيروسات التى مادتها الوراثية خيط مزدوج من الـDNA والتى تهاجم الحيوانات.

Aggressive gene therapy العلاج الجينى العدوانى
علاج السرطان بإدخال الجينات أو ناتج الجين الذى يعمل على قتل الخلايا السرطانية.

AIDS (Acquired immunodeficiency syndrome) نقص المناعة المكتسبة
هو المرض الذى يسببه الفيروس HIV والذى يصيب النظام المناعى عن طريق تكسير الخلايا المناعية التائية (T cells).

Allele الأليل
هو واحد من بين الأشكال المختلفة لجين ما.

Amino acid الحامض الأمينى
هو أى واحد من قسم الجزيئات العضوية التى تحتوى على مجموعة أمينو ومجموعة كربوكسيل. ويوجد ٢٠ حامض أمينى مختلفة والتى يتركب منها البروتينات المختلفة.

Amino acid attachment site

موقع ارتباط الحامض الأمينى
هو الطرف 3' من جزيء الـtRNA والذى يرتبط به الحامض الأمينى.

Aminoacyl site (A site)

موقع دخول الحامض الأمينى
هو أحد مكونات الريبوسوم التى يرتبط بها الـtRNA ويعرف بالموقع A (A sit).

Aminoacyl tRNA synthetase

إنزيم ربط الحامض الأمينى بالـtRNA
هو الذى يربط الحامض الأمينى الصحيح بالحامض النووى الناقل tRNA الخاص بنقل هذا الحامض الأمينى.

Amino terminous

مجموعة الأمينو الطرفية
هو طرف السلسلة عديدة الببتيد والتى تنتهى بحامض أمينى يحمل مجموعة أمينو حرة.

Antibody

الجسم المضاد
هو بروتين ما يوجد فى سيرم الدم وينتج فى الحيوانات استجابة لأنتيجين خاص والقادر على الارتباط بالأنتيجين.

Anticodon

الشفرة المضادة
هى القواعد الثلاثة فى جزيء الـtRNA والمكملة لثلاثة قواعد لشفرة خاصة فى الـmRNA

Antigen

أنتيجين
أى مادة قادرة على تنبيه إنتاج أجسام مضادة خاصة الجين المسرطن المضاد
هو الجين الذى يعمل لمنع الانقسام الخلوى غير المرغوب مثل الجين المكبت للورم.

Antiparallel

الإتجاه المعاكس
هو مصطلح يستخدم لوصف الإتجاه الكيميائى

لخيطى الـDNA فى الحلزون المزدوج للـDNA حيث يكون الإتجاه 3' ← 5' فى إتجاه معاكس للآخر.

Antisense (Noncoding)

خيط الـDNA غير الشفرى
خيط الـDNA الذى يحمل التتابع النيوكليوتيدى غير المكمل لذلك التتابع النيوكليوتيدى الموجود بالـmRNA.
Antisense RNA

خيط الـRNA المكمل لخيط الـmRNA
هو خيط الـRNA الذى يحمل التتابع النيوكليوتيدى المكمل لخيط الـmRNA والذى يحدث بينهما الاقتران بين أزواج القواعد.

Apoptosis (Programmed cell death)

الموت الخلوى
هو البرنامج الوراثى الذى يقوم بإزالة الخلايا التى أصابها الضرر أو لخلايا التى ليس هناك حاجة اليها بدون تنشيط النظام المناعى.

Apoptosome

ابوبتوسوم
هو مجموعة من الاشارات البروتينية المركبة والتى تنشط المركب Caspase-3 فى الثدييات أثناء الموت الخلوى.

Aporepressor

آبوريبريسور
هو البروتين الذى يتحول إلى كابيت عندما يرتبط به جزيء خاص آخر.

ATP (Adenosine triphosphate)

الأدينوزين ثلاثى الفوسفات
الأدينوزين ثلاثى الفوسفات وهو الجزيء الأولى لتخزين الطاقة فى الخلية الحية.

B

B cells

الخلايا البائية
خلايا الدم البيضاء والمشتقة من نخاع والتى تمتلك القدرة على إنتاج الاجسام المضادة.

Backcross

التلقيح العكسى
هو تلقيح الجيل الأول F₁ الخليط مع أى فرد يحتوى على نفس التركيب الجينى لأحد الأبوين.

Bacteriophage

بكتيريوفاج
هو فيروس عائله الخلية البكتيرية ويسمى بالفاج بصفة عامة.

Base pair

زوج القواعد
زوج من القواعد النيتروجينية وغالباً ما تكون إحداها قاعدة بيورينية والأخرى بيريميديّة واللذان يرتبطان بعضهما بروابط هيدروجينية فى خيطى الـDNA مزدوج الخيط.

β-Galactosidase

إنزيم بيتاجالكتوسيديز
هو الإنزيم الذى ينتجه جين ما فى اوبرون اللاكتوز والمسئول عن تكسير سكر اللاكتوز.

Bioremediation

البيورييمديشن
استخدام كائنات دقيقة مثل الفطر أو النبات أو الإنزيم لتنظيف البيئة أو إعادة البيئة لحالتها الطبيعية.

Blunt ends

الأطراف العمياء
هو نهاية جزيء الـDNA والذى يكون فيه كل أزواج القواعد الطرفية مرتبطة ببعضها بروابط هيدروجينية ويستخدم هذا الإصطلاح عادة ليشير إلى الأطراف الناتجة التى يحدثها بعض إنزيمات القطع المحدد.

Bt toxin

المركب السام Bt
هو المركب السام الذى يوجد فى بكتيريا التربة والذى يقتل بعض أنواع يرقات الحشرات التى تحطم المحاصيل.

C

Callus

الكالس
مجموعة أو كتلة من الخلايا غير المتشكلة من الخلايا النباتية.

Callus culture زراعة الكالس
إعادة تشكيل كتلة من النسيج النباتي في أنبوبة الاختبار ثم بعد ذلك تنمية النسيج غير المتشكل في طبق بترى.

Cancer السرطان
هو نسيج أو مجموعة من الخلايا المتجمعة والناجم عن نمو الخلية وانقسامها بطريقة غير متحكم فيها وان هذا الانقسام الخلوي يرجع إلى حدوث طفرات جسمية تؤثر على الانقسام الخلوي.

Carboxyl terminous مجموعة الكربوكسيل الطرفية
هو طرف السلسلة عديدة الببتيد التي تنتهي بحامض أميني يحمل مجموعة كربوكسيل حرة.

Carcinogen المسرطن
هو مركب طبيعي أو كيميائي يسبب السرطان.

c-DNA strand خيط الـ c-DNA
هو خيط مكمل لأحد خيطي الـ DNA.

Cell cycle دورة الخلية
هي دورة النمو للخلية المفردة في الكائنات حقيقية النواة والتي تنقسم إلى المراحل G_1 , S, G_2 , M.

Charged tRNA الـ tRNA المحمل
هو أي حامض نووي ناقل (tRNA) محمل بحامض أميني مرتبط به.

Chimeric animal الحيوان الكيميري
هو الحيوان الذي تختلف خلاياها المختلفة في التركيب الوراثي.

Chloroplast transit peptide ببتييد البلاستيدات الخضراء الموقت
سلسلة عديدة الببتيد صغيرة تضاف إلى الطرف الذي يحتوي على مجموعة الأمينو إلى بروتين ما يوجه دخول البروتين من الريبوسوم إلى البلاستيدات الخضراء.

Chromatin الكروماتين
هو ارتباط الـ DNA ببروتينات الهستون ليكوّن كروموسومات الكائنات حقيقية النواة.

Chromosome كروموسوم
في الكائنات حقيقية النواة هو عبارة عن جزيء الـ DNA الذي يحمل الجينات في ترتيب طولي حيث يرتبط به عديد من البروتينات ويحتوي الكروموسوم إلى تلومير في كلا طرفيه وسنترومير. وفي الكائنات غير حقيقية النواة يرتبط بالـ DNA قليل من البروتينات وينقصه التلومير والسنترومير وغالباً ما يكون دائري. وفي الفيروسات قد يكون الكروموسوم عبارة عن الـ DNA أو الـ RNA مفرد الخيط أو مزدوج الخيط في صورة خطية أو دائرية وغالباً ما يكون خالياً من البروتينات.

Cis position الوضع التجاذبي
هو ترتيب الجينات المرتبطة في فرد ما خيط في طفرتين حيث حصل على الموقعين الطفرين من أحد الأبوين بينما حصل على الموقعين البريين من الأب الآخر مثل $a^1a^2/++$.

Cistron سسترون
هو ذلك التابع النيوكليوتيدي من الـ DNA الخاص بوظيفة مفردة كما تم تعريفه بواسطة اختبار التكامل. وهو التابع النيوكليوتيدي الذي يحمل شفرات نوع واحد من البروتينات يعرف بالجين.

Clone الكلون
مجموعة من الكائنات المشتقة من أب مفرد والمتطابقة وراثياً مع هذا الأب وأيضاً في الهندسة الوراثية يشير هذا الاصطلاح إلى ربط جين ما أو قطعة من الـ DNA إلى جزيء من الـ DNA قادر على التضاعف مثل البلازميد أو الفاج.

Cloned animals الحيوانات المكلونه
حيوانات متطابقة وراثياً اشتقت من نفس الخلية الأصلية.

Cloning vectors حوامل الكلونه
هو أى جزيء من الـDNA قادر على التضاعف الذاتى داخل خلية ما ويستخدم فى حمل الجينات المكلونه أو قطع من الـDNA وغالباً ما يكون بلازميدات أو فيروسات محوره .

Cloning vehicle حامل الكلونه
هو جزيء من الـDNA قادر على التضاعف والذي حدث به إدخال لجين ما أو قطعة من الـDNA عن طريق تكتيكات إعادة توليف الـDNA وأيضاً يسمى بالحامل vector.

Coding strand الخيط الشفرى أو الخيط القالب
فى جين ما هو ذلك الخيط من الـDNA الذى يحدث له نسخ.

Codon الشفرة
هو ذلك التتابع من ثلاثة نيوكليوتيدات فى جزيء الـmRNA الخاص بالتعبير عن حامض أمينى أو كإشارة توقف لاستمرار تخليق البروتين.

Cohesive ends الأطراف المتكحمة
خيوط الـDNA المفردة المكمله عند أطراف الـDNA مزدوج الخيط.

Complementary DNA خيط الـDNA المكمل
هو جزيء الـDNA الناتج من نسخ خيط الـRNA بواسطة إنزيم النسخ العكسى ويشار إليه عادة بالـc-DNA.

Complementation test اختبار التكامل
هو اختبار وراثى لتحديد وقوع طفرتين فى نفس الوحدة الوظيفية وبالتالي تكون طفرات أليلية أو أنهما

يقعان فى وحدتين وظيفيتين مختلفتين وبالتالي تكون غير أليلية.

Conserved sequence

التتابع النيوكليوتيدى المحفوظ

هو ذلك التتابع من القواعد بالـDNA والذي نادراً ما يحدث له تغيير طفيف جداً بعد ملايين من السنين

Core enzyme الإنزيم المركزى
هو جزيء إنزيم البلمرة RNA polymerase الذى ينقصه الوحدة البروتينية التى تتعرف على البروموتور.

D

Deletion النقص
فقد قطعة من المادة الوراثية لكروموسوم ما.

Deoxyribonuclease

إنزيم الديزوكسى ريبونوكلييز
هو إنزيم ما يكسر الرابطة الفوسفودايستر فى الـDNA مكوناً قطع من الـDNA أو نيوكليوتيدات.

Deoxyribose الديزوكسى ريبوز
سكر خماسى يوجد فى الـDNA.

Diploid الحالة الثنائية من الكروموسومات
هو الخلية أو الكائن الذى يحتوى على مجموعتين كاملتين من الكروموسومات المتماثلة.

Direct repeat التكرار المباشر
نسختين من الـDNA أو الـRNA التى تحتوى على نفس التتابع فى نفس الإتجاه من النيوكليوتيدات.

DNA (Deoxyribonucleic acid)

حامض الديزوكسى ريبونوكليك
هو جزيء كبير يتركب عادة من سلسلتين عديدة النيوكليوتيدات فى صورة حلزون مزدوج الخيط

الجنين

Embryo

كائن ما في مراحل النمو الأولى.

خلايا الجذع الجنينية Embryonic stem cell

الخلايا الجذعية المشتقة من مرحلة البلاستوسيت للجنين.

إنزيم الإندونوكلييز Endonuclease

الإنزيم الذى يكسر الروابط الفوسفودايستر الداخلية فى الـDNA المفرد الخيط أو المزدوج الخيط وكذلك خيط الـRNA.

المعزز Enhancer

هو ذلك التتابع من القواعد فى جينوم الكائنات حقيقية النواة والفيروسات التى تهاجم الكائنات حقيقية النواة والذي يسبب زيادة فى معدل نسخ الجينات القريبة منه.

إنزيم Enzyme

هو البروتين أو مجموعة من البروتينات المتجمعة بترتيب معين والذي تحفز تفاعل بيوكيميائى ولا يحدث لها تحول أثناء عملية التحفيز.

التغير الإبيجيني Epigenetic change

يشير هذا الاصطلاح إلى التغيرات الوراثية والتى لا ترجع إلى تحورات فى التتابع النيوكليوتيدى للـDNA وكذلك التغيرات فى تنظيم الجين ولكنه لا يورث بواسطة أى من نسل النبات.

الايوكروماتين Euchromatin

هو الكروماتين أو منطقة من الكروموسوم والتى لها خصائص صبغ طبيعية وتخضع لدورة التكثيف الطبيعى ونسبياً تكون غير ملتفة أو محزنة فى نواة الدور البينى ومن الواضح أنها تحتوى على معظم الجينات.

الكائنات حقيقية النواة Eukaryote

هى الخلية أو الكائن الذى يتركب من الخلايا التى تحتوى على أنوية حقيقية تحتوى على الـDNA

والذى يحمل المعلومات الوراثية فى كل الخلايا وعديد من الفيروسات.

إنزيم الـDNA ليغاز DNA ligase

هو الإنزيم الذى يحفز تكوين روابط تعاونية بين الأطراف 3'-OH و 5'-P فى خيط الـDNA عديدة النيوكليوتيدات المكسورة فى جزء الـDNA مزدوج الخيط.

إنزيم بلمرة الـDNA DNA polymerase

هو الإنزيم الذى يحفز تخليق الـDNA فى الإتجاه 3' ← 5' فى وجود خيط الـDNA القالب.

اصلاح الـDNA DNA repair

أى عملية من العمليات العديدة المتنوعة لإستعادة التتابع النيوكليوتيدى الصحيح للـDNA والذي حدث به إدخال لنيوكليوتيدات غير صحيحة أو التى حدث لها تحول بأى طريقة ما.

تضاعف الـDNA DNA replication

هى عملية نسخ جزء الـDNA.

E

البروتين EIA EIA protein

هو البروتين المبكر الذى ينتجه الأدينوفيرس والذي يعزز نسخ جينات الفيروس فى العدوى المبكرة والذي يرتبط ببروتين الخلية العائلة Rb.

الفصل الكهربائى Electrophoresis

هو التكنيك أو الطريقة المستخدمة لفصل الجزيئات على أساس الاختلاف فى معدل حركتها باستخدام مجال كهربائى خلال سائل أو جيل ما وتسمى غالباً هذه الحركة باسم الهجرة الكهربائية.

الإطالة Elongation

إضافة الأحماض الأمينية إلى السلسلة عديدة الببتيد النامية.

الحيوان المؤسس **Founder animal**
هو الحيوان الذى يعتبر العائل الأصلى للجين المنقول واستمراره بثبات.

البلازميد F **F plasmid**
هو بلازميد بكتيرى غالباً ما يسمى بالعامل F أو عامل الخصوبة أو بلازميد الجنس والقادر على الانتقال بنفسه من الخلية العائلة (F^+) إلى خلية أخرى لا تحتوى عليه (F^-) وعندما يندمج العامل F بالكروموسوم البكتيرى يصبح الكروموسوم البكتيرى قادر على الانتقال إلى الخلية F خلال عملية الاقتران البكتيرى.

طفرة تغيير القالب الشفرى **Frameshift mutation**
هى الطفرة التى تحدث بسبب إما نقص أو إضافة زوج أو أكثر من النيوكليوتيدات فى جين ما ينتج عنه تغيير القالب الشفرى لكل الشفرات التى تلى موقع حدوث الطفرة فى الجين.

G

جاميطة **Gamete**
هى الخلية التناسلية الناضجة مثل الحيوان المنوى أو البويضة فى الحيوانات.

جين **Gene**
وحدة التوارث والذى يحتل موقع كروموسومى ثابت ويحتوى على المعلومات اللازمة لتكوين سلسلة عديدة الببتيد.

تضخيم الجين **Gene amplification**
هى الخلية التى بها بعض الجينات المعينة تخضع للتضاعف إما داخل الكروموسوم أو خارج الكروموسوم مسبباً ذلك زيادة عدد نسخ الجين.

داخل غلاف نووى كما تحتوى الخلية على العضيات الخلوية السيتوبلازمية ويحدث فى هذه الخلايا الانقسام الميوزى والميوزى.

التطور **Evolution**
تراكم التغيرات فى الخصائص الوراثية للأنواع مع مرور الزمن.

استئصال **Excision**
إزالة قطعة من الـDNA من كروموسوم ما مثل استئصال البروفاج من الكروموسوم البكتيرى.

إنزيم اكسيونيز **Excisionase**
الإنزيم الذى تتطلبه عملية استئصال البروفاج والذى يعمل مع إنزيم الإنتيجريز *Integrase*.

إكزون **Exon**
هو قطع من الـDNA لجين ما تنسخ وتترجم إلى سلسلة عديدة الببتيد وتتفصل هذه القطع عن بعضها بتتابعات من النيوكليوتيدات لا تترجم تسمى بالإنترونات وتوجد كل من الإكزونات والإنترونات أساساً فى جينات الكائنات حقيقية النواة.

إنزيم اكسونيوكليز **Exonuclease**
هو الإنزيم الذى يزيل النيوكليوتيدات الطرفية من السلسلة عديدة النيوكليوتيدات بكسر الرابطة الفوسفودايستر الطرفية حيث يحدث إزالة للنيوكليوتيدات الطرفية بنجاح واحدة تلو الأخرى وغالباً ما يكون هذا الإنزيم خاص بالـDNA مفرد الخيط أو مزدوج الخيط وكذلك الـRNA مفرد الخيط.

F

الأم الحاضنة **Foster mother**
يستخدم هذا الاصطلاح فى مجال الوراثة ليشير لأنثى الحيوان التى تحمل الجنين المهندس وراثياً.

Gene expression التعبير الجيني

هي العملية متعددة الخطوات حيث يحدث تخليق ناتج الجين.

Gene library مكتبة الجينات

هي مجموعة كبيرة من حوامل الكلونة تحتوي على المجموعة الكاملة لقطع الـ DNA لجينوم كائن ما.

Gene product ناتج الجين

يستخدم هذا الاصطلاح للتعبير عن السلسلة عديدة الببتيد الناتجة من ترجمة الـ mRNA المنسوخ من على جين ما. وإذا لم يحدث ترجمة الـ RNA (مثل الـ rRNA) يسمى جزيء الـ RNA الناتج باسم ناتج الجين.

Gene therapy العلاج الجيني

استحداث تحور في جينوم كائن راقى بإضافة حامل كلونة يحتوي على جين معين لإزالة الضرر الوراثي أو الفشل الوراثي في الإنسان.

Genetic code الشفرة الوراثية

هي مجموعة من الشفرات الوراثية الثلاثية والبالغ عددها 64 شفرة تناظر الشفرات اللازمة للتعبير عن الأحماض الأمينية المختلفة وكذلك للتعبير عن شفرات بداية وانتهاء تخليق السلسلة عديدة الببتيد.

Genome جينوم

مجموعة الجينات الكاملة الموجودة بالخلية أو الفيروس وغالباً ما يستخدم في الكائنات حقيقية النواة للإشارة إلى كل الجينات الموجودة في الخلية أحادية الكروموسومات (Haploid).

Genotype التركيب الجيني

هي البنية الوراثية لكائن ما أو فيروس والتي تميز الشكل المظهرى للكائن وغالباً ما يستخدم للإشارة للتركيب الأليلي لجين ما أو مجموعة من الجينات القليلة تحت الدراسة.

Germinal mutation الطفرات التناسلية

هي الطفرات التي تحدث في الخلية التي يشتق منها الجاميطات.

Germline الخلايا التناسلية الأولية

الخلايا التناسلية التي تنتج البويضات أو الحيوانات المنوية والتي لها دور في تكوين الجيل التالي في الكائنات حقيقية النواة.

Glyphosate الجليفوسات

مبيد حشائش يسبب قتل الحشائش عن طريق تثبيط تخليق الأحماض الأمينية الأروماتية في النباتات.

H

H1, H2A, H2B, H3, H4

البروتينات الهستونية

هي الهستونات الخمسة الرئيسية في الكروماتين.

Haploid الحالة الاحادية العدد الكروموسومي

الخلية أو الكائن الذي يحتوي على مجموعة واحدة من الكروموسومات.

Helper virus الفيروس المساعد

هو الفيروس الذي يقدم الوظائف الأساسية للفيروسات الناقصة.

Helicase إنزيم الهليكيز

الإنزيم الذي يشترك في تضاعف الـ DNA عن طريق مساعدته في فك خيطي الـ DNA بالقرب من شوكة التضاعف.

Hemizygous الهيميزيجس

هو الجين الذي يوجد في صورة جرعة واحدة كما هو الحال في حالة كروموسوم X في الذكور للخلية.

Histocompatibility تقبل النسيج

هي تقبل النسيج المعاد زراعته في الكائن المستقبل.

Histone الهستون
أى بروتينات صغيرة قاعدية ترتبط بالـDNA فى صورة كروماتين والهستونات الخمسة الأساسية هى H1, H2A, H2B, H3, H4

Histone acetyl transferanse (HAT)
إنزيم هستون أسيتايل ترانسفيريز
هو الإنزيم الذى يضيف مجاميع الأسيتايل للهستونات.

Histone deacetylase (HAD)
إنزيم هستون دى أسيتيليز
هو الإنزيم الذى يزيل مجاميع الأسيتايل من الهستون.

HIV (Human immunodeficiency virus)
فيروس نقص المناعة فى الإنسان
هو أحد أعضاء عائلة الروتروفيروسات والذى يسبب نقص المناعة فى الإنسان (الايدز AIDS).

Homologous التماثل
يستخدم للإشارة للـDNA الذى يحمل نفس التتابع النيوكليوتيدى.

Homologous chromosomes
الكروموسومات المتماثلة
هى زوج الكروموسومات التى تقترن مع بعضها أثناء الإنقسام الميوزى والتى لها نفس التركيب وتحتوى على نفس المواقع الوراثية.

Homozygote التركيب الجينى المتماثل
هو الكائن الثنائى الكروموسومات أو متعدد الكروموسومات المتضاعفة الذى يحتوى على نفس الأليل عند موقع معين.

Hormone هرمون
جزء صغير فى الكائنات حقيقية النواة والذى يحدث له تخليق فى أنسجة خاصة والذى ينظم نشاط خلايا أخرى خاصة وفى الحيوانات تنتقل الهرمونات من مصدرها إلى النسيج الهدف عن طريق مجرى الدم.

Hybrid هجين
هو الفرد الناتج من تزاوج أبوين غير متشابهين وراثياً أو هو جزء الـDNA مزوج الخيط الناتج من مصدرين مختلفين.

Hydrogen bond رابطة هيدروجينية
هى رابطة غير تعاونية ضعيفة.

I

Immunity المناعة
هو اصطلاح عام يشير إلى مقاومة الكائن لمواد معينة ولكنه له عديد من المعانى الخاصة. ففى الحيوانات الراقية يشير إلى القدرة على الاستجابة للجزيئات الأجنبية عن طريق تخليق البروتينات التى تسمى الأجسام المضادة والتى تجعل الجزيئات الأجنبية غير فعالة ويشير كذلك فى الحيوانات إلى عدم قابليتها للإصابة أو العدوى بواسطة العوامل المسببة للمرض. وفى النظم البكتيرية يشير هذا الاصطلاح إلى مقاومة البكتيريا للتحلل بواسطة الفاج وكذلك المقاومة للبكتيريا التى تحتوى على البلازميد الذى يحتوى على جينات البروتينات السامة.

Immunoresponse الاستجابة المناعية
هى الظاهرة التى يتعرض فيها كائن ما إلى جزء أجنبى ينتج عنها تخليق جسم مضاد يُوجّه تجاه الجزء الأجنبى وإعادة تخليقه عندما يتعرض الكائن بعد ذلك لنفس الجزء الأجنبى وكذلك يشير أيضاً إلى المقاومة الكاملة أو الجزئية للعدوى التى تلى العدوى السابقة بنفس العامل المسبب للمرض.

Inducer المُحفّز
هو الجزء الذى يبدى تأثير تنظيمى بارتباطه بالبروتين المنظم.

Inducible enzyme الإنزيم المُحفّز
هو الإنزيم الذى يحدث له تخليق فقط فى وجود مادة تفاعله أو بعض الجزيئات الكيميائية المعينة الشبيهة

بمادة تفاعله والإنزيمات المحفزة عكس الإنزيمات التي تنتج بصورة مستمره.

Inducible promoter البروموتور التحفيزي
هو البروموتور الذي يكون فعالاً فقط تحت ظروف خاصة.

Initiation factors عوامل البداية
هي البروتينات التي تحتاجها عملية ابتداء تخليق البروتينات ويرمز لها بالرمز IF في الكائنات غير حقيقية النواة وبالرمز eIF في الكائنات حقيقية النواة متبوعاً برقم ما.

Insulator العازل
هو ذلك التتابع من الـ DNA الذي يحجب تأثير المعززات.

Insulin الانسولين
هرمون بروتيني صغير يصنع بواسطة البنكرياس والذي يتحكم في مستوى السكر في الدم.

Insulin receptor مستقبل الانسولين
بروتين على سطح الخلية والذي يعمل كمستقبل لهرمون الانسولين.

Integrase إنزيم الانتيجريز
هو الإنزيم الذي يحفز حدوث التبادل عند موقع خاص والذي يحدث عندما يدمج البروفاج في الكروموسوم البكتيري أو عندما يحدث استئصال للبروفاج من الكروموسوم البكتيري ولكن في عملية الاستئصال تحتاج أيضاً إلى بروتين اضافي هو إنزيم اكسيونيز Excisionase.

Integration الإدماج
هي العملية التي بواسطتها يحدث ادماج كامل لجزيء الـ DNA في جزيء DNA آخر قادر على التضاعف كما في حالة ادماج البروفاج أو إدماج البلازميد أو الـ DNA الفيروسي في كروموسوم ما.

Interferons الاتروفيرونات
هي عائلة من البروتينات يحدث لها تحفيز في الخلايا الحيوانية إستجابة للعدوى الفيروسية.

Intergenic complementation
التكامل بين الطفرات في الجينات المختلفة
حدوث التكامل بين الطفرات في جينات مختلفة.

Intragenic complementation
التكامل بين الطفرات في نفس الجين
حدوث التكامل بين الطفرات في نفس الجين.

Intron الإنترون
هو تلك المناطق من الجين التي تتسخ ولا تترجم إلى أحماض أمينية في البروتين الناتج من نسخ وترجمة الجين والتي يحدث لها استئصال من المنسخ الأولى لتكوين جزيء الـ mRNA الناضج في الكائنات حقيقية النواة.

Inverted repeat المكررة المعكوسة
هي تتابعات من القواعد في الـ DNA والذي يكون إتجاهها في جزيء معين من الـ DNA في إتجاه معاكس لبعضها البعض وغالباً ما تتواجد في نهايات العناصر المنتقلة من الـ DNA

In vitro experiment
التجربة في أنبوبة اختبار
هي التجربة التي تجرى باستخدام المكونات المستخلصة من الخلايا.

In vivo experiment
التجربة في الخلية الحية
هي التجربة التي تجرى باستخدام الخلايا الكاملة.

L

Lac I repressor البروتين الكابت I
هو البروتين الكابت الذي ينظم التعبير الجيني لجينات اوبرون اللاكتوز.

Lac operon **اوبرون اللاكتوز**
مجموعة الجينات التي يحتاجها ميتابولزم سكر اللاكتوز في البكتيريا.

Lactose **اللاكتوز**
سكر ثنائي يتكون من سكر الجلوكوز والجالكتوز.

Lactose acetylase **إنزيم لاكتوز أسيتيليز**
هو البروتين الناتج من الجين lac A في اوبرون اللاكتوز ووظيفته غير معروفة في ميتابولزم سكر اللاكتوز.

Lactose permease **إنزيم الاكتوزبرميز**
هو الإنزيم المسئول عن نقل سكر اللاكتوز من البيئة إلى داخل الخلية البكتيرية.

Lac z gene **الجين lac z**
هو أحد جينات اوبرون اللاكتوز التركيبية الذي ينسخ ويترجم إلى إنزيم بيتاجلاكتوسيديز ويستخدم على نطاق واسع في مجال الهندسة الوراثية كجين مخبر.

Lagging strand **الخط المتكسّر**
هو خيط الـDNA المفرد الذي يحدث له تخليق في صورة قطع من الـDNA والتي تتصل ببعضها في النهاية.

Leading strand **الخط المتقدم**
هو خيط الـDNA المفرد الذي يحدث له تخليق بصورة مستمرة.

Lethal mutation **الطفرة المميتة**
هي الطفرة التي ينتج عنها موت الفرد الحامل لها قبل أن يصل إلى مرحلة التكاث.

Lipofection **الليبوفيكشن**
استخدام الليبوسوم في نقل الـDNA أو البروتينات إلى الخلية الهدف.

Liposome **الليبوسوم**
أوعية مجوفة تحاط بغلاف من الفوسفوليبيدات والتي قد تستخدم في توصيل عديد النيوكليوتيدات أو العقاقير الطبية أو جزيئات أخرى عبر الغلاف الخلوي للخلايا المستقبلة.

Locus **الموقع**
هو موقع جين ما على كروموسوم ما.

Locus control region **موقع منطقة التحكم**
هو ذلك التابع النيوكليوتيدي من الـDNA المنظم في الكائنات حقيقية النواة والذي يتواجد في مقدمة مجموعة الجينات المتجمعه التي يتحكم فيها.

Long terminal repeats (LTRs) **المتابعات الطرفية المتكررة الطويلة**
هي مكررات من عديد من مئات من أزواج القواعد والتي تتواجد في أطراف الرتروفيروسات.

Lox P site **الموقع lox P**
هو تتابع خاص من النيوكليوتيدات والتي يتعرف عليها إنزيم الريبومبسينز Recombinase.

Luc gene **الجين luc**
هو الجين الذي يحمل شفرات إنزيم الليوسيفيريز في الكائنات حقيقية النواة.

Luciferase **إنزيم الليوسيفيريز**
هو الإنزيم الذي يصدر ضوءاً عندما توجد مادة تفاعله الليوسيفرين.

Luciferin **الليوسيفيرين**
ماده كيميائية يستخدمها إنزيم الليوسيفيريز ليصدر ضوءاً.

Lux gene **الجين lux**
هو الجين الذي يحمل شفرات إنزيم الليوسيفيريز في البكتيريا.

Lysis التحلل
تكسير الخلية البكتيرية بسبب تمزيق غلافها الخلوي.

M

Metallothioneine الميتالوثيونين

هو البروتين الذي يرتبط به العناصر الفلزية والذي يحفز تخليقه فقط عندما تتواجد عناصر ثقيلة معينة.

Metallothioneine promoter

بروموتور ميتالوثيونين

هو بروموتور الجين الذي يحمل شفرات بروتين الميتالوثيونين ويستخدم في الهندسة الوراثية لأنه بروموتور قوى جداً ويحفز عن طريق كميات ضئيلة من الزنك أو عناصر فلزية أخرى.

Metastasis ميتاستاسيس

هي العملية التي تتحرك فيها الخلايا السرطانية من الورم الأولي إلى أجزاء الجسم وكذلك من السرطانات الثانوية.

Messenger RNA (mRNA)

الـ RNA الرسول

هو جزيء الـ RNA الناتج من نسخ خيط الـ DNA القالب وله القدرة على ترجمته إلى أحماض أمينية في السلسلة عديدة الببتيد.

Methylation إضافة مجموعة ميثايل

هي تحويل قاعدة بالـ DNA أو الـ RNA بإضافة مجموعة ميثايل.

Minisatellite الميني ساتيللايت

هو اصطلاح آخر للمكررات المتتالية من الـ DNA ذات الاعداد المختلفة.

Missense mutation الطفرة خاطئة المعنى

هي الطفرة التي تحدث نتيجة لتغير شفرة واحدة وبالتالي يحدث إحلال لحامض أميني محل آخر في البروتين الناتج.

Mitochondrial death pathway

ممر الموت الميتوكوندري

هو برنامج الموت الخلوي والذي يتضمن تنشيط بروتينات الميتوكوندريا لقتل الخلية وغالباً ما يحدث هذا التنشيط بواسطة عوامل داخلية مثل الضرر الذي يحدث للـ DNA.

Mono cistronic mRNA

الـ mRNA أحادي السسترون

هو جزيء الـ mRNA الذي يحمل المعلومات الوراثية لسسترون مفرد والذي يحمل بدوره الشفرات اللازمة لتكوين نوع واحد من البروتينات.

Mosaic موزايك

فرد ما يتركب من طرازين أو أكثر من الخلايا المختلفة وراثياً.

M phase (Mitosis phase) المرحلة M

هي المرحلة الرابعة من دورة الخلية في الكائنات حقيقية النواة والتي تنقسم فيها الخلية وتعرف أيضاً بالميتوزي.

Mutagen المطفر

عامل ما يكون قادر على زيادة معدل الطفور.

Mutagenesis التطفر

هي العملية التي يخضع فيها جين ما لحدوث تحور وراثي وأيضاً تسمى بالطفرة.

Mutant allele الأليل الطافر

هو الأليل الذي يختلف عن الأليل الطبيعي أو الأليل البري وأيضاً هو للفرد الذي به أليل ما يظهر تعبيره على الشكل المظهري.

Mutation الطفرة

هو التحور في الجين والذي يورث وأيضاً هي العملية التي يكتسب من خلالها الجين التغير الوراثي.

Mutation rate معدل الطفور

احتمال حدوث طفرة جديدة عند موقع ما إما لكل جامطة أو لكل جيل.

N

Neomycin phosphotransferase

إنزيم نيوميسين فوسفوترانسفيريز هو الإنزيم الذي يشجع المقاومة للمضادات الحيوية مثل النيوميسين والكاناميسين.

N-formyl methionine (f met)

N-فورمايل ميثيونين

هو الحامض الأميني الميثيونين المضاف إليه مجموعة الفورمايل والذي يستخدم كأول حامض أميني في السلسلة عديدة الببتيد عند تخليق البروتين في البكتيريا.

Nonsense mutation الطفرات عديمة المعنى

هي الطفرة التي تغير شفرة خاصة بحامض أميني إلى إحدى الشفرات التي لا تعبر عن حامض أميني (شفرة إنهاء الترجمة) وينتج عن ذلك تكوين سلاسل عديدة الببتيد غير كاملة.

Nuclease إنزيم النيوكلييز

هو الإنزيم الذي يكسر الرابطة الفوسفودايستر في الـDNA أو الـRNA.

Nuclear microinjection

الحقن النووي الدقيق

هو الطريقة المستخدمة في ادخال الـDNA الأجنبي في نواة الخلية العائلة.

Nuclear pores ثقب الغلاف النووي

هي الثقوب في الغلاف النووي التي تسمح للبروتينات والـRNA والجزيئات الأخرى من الدخول أو الخروج من النواة.

Nucleoid النيوكلويد

وتوجد بالسيتوبلازم في الخلايا غير حقيقية النواة والبلاستيدات الخضراء والميتوكوندريا وغالباً يشير إلى وحدة الـDNA الرئيسية في البكتيريا.

Nucleoside

نيوكليوسيد

هي ارتباط القاعدة البيورينية أو البيريميدينية بروابط تعاونية بسكر الريبوز أو الديلوكسي ريبوز .

Nucleosome

نيوكليوسوم

هي الوحدة الأساسية المتكررة للكروماتين وتتركب من جزيء يتركب من جزيئين كل منهما أحد بروتينات هستون الأربعة المختلفة تحيط بطول من الـDNA يحتوى على 145 زوج من النيوكليوتيدات الملتفة وتتصل بجزيء مركزي آخر مجاور يحتوى على 55 زوج من النيوكليوتيدات من الـDNA الرابط والمرتبط بالطراز الخامس من بروتين الهستون.

Nucleotide

نيوكليوتيد

ارتباط الفوسفات بالنيوكليوسيد.

O

Okazaki fragment

قطعة اوكازاكي

هي أحد قطع الـDNA القصيرة الناتجة أثناء التضاعف المتقطع لخيط الـDNA المثلثي.

Oncogene

الجين المُسرطن

هو ذلك الجين الذي يُنشط ابتداء تكوين الورم.

Oncogenic virus

الفيرس المُسرطن

هو الفيرس الذي يسبب السرطان.

Oocyte

خلية البويضة

خلية البويضة الأولية.

Operator

أوبريتور

هو المنطقة المنظمة في الـDNA التي تتفاعل مع بروتين كابيت خاص وذلك للتحكم في نسخ الجينات التركيبية المجاورة.

Operon

أوبرون

مجموعة الجينات التي يتم تنظيم تعبيرها بواسطة كل من أوبريتور ما وجين كابيت ما.

Origin منشأ
هو منشأ التضاعف وهو عبارة عن تتابع من قواعد الـDNA والتي يحدث عندها ابتداء تضاعف الـDNA.

P

P21 protein البروتين P21
هو البروتين الذي يغلق الانقسام الخلوي بارتباطه بالسيتكلينات وتنشيطها.

P53 gene الجين P53
هو جين المضاد للسرطان والذي يطفر غالباً في الخلايا السرطانية.

P site (peptidyl site) الموقع P من الريبوسوم
الموقع من الريبوسوم الذي يحدث فيه تكوين الرابطة الببتيدية.

Palindrome بالندروم
هو تتابع معين يحتوى ما بين ٤ إلى ٨ نيوكليوتيدات بترتيب معين يوجد بالـDNA تتعرف عليه إنزيمات القطع المحدد حيث تقوم هذه الإنزيمات بكسر الرابطة فوسفودايستر عند هذه التتابعات بصورة متناظرة في كلا خيطى الـDNA تنتج عنها أطراف 3'-OH و 5'-P تعرف بالأطراف العمياء أو تحدث كسور عند مناطق غير متناظرة داخل بالندروم في كلا خيطى الـDNA مكونة أطراف 3'-OH و 5'-P تعرف بالأطراف الملحمة.

P elements العناصر P
هى الترنسبوزونات التى وجدت فى الدروسوفيلا والحشرات الأخرى.

Peptide bond رابطة ببتيدية
هو رابطة تعاونية بين مجموعة الأمينو فى حامض أمينى ما ومجموعة الكربوكسيل فى حامض أمينى آخر.

Peptidyl transferase

إنزيم ببتيديل ترانسفيريز
هو النشاط الإنزيمى للريبوسومات المسؤولة عن تكوين الرابطة الببتيدية حيث يتكون الموقع النشط من هذا الإنزيم من عديد من البروتينات الريبوسومية.

Phage الفاج
هو الفيروس الذى يهاج البكتيريا ويسمى أيضاً بالبكتريوفاج.

Phenotype الشكل المظهري
هو الخصائص المشاهدة لخلية ما أو لكائن ما أو الناتجة من تفاعل التركيب الجينى مع البيئة.

Phosphodiester bond الرابطة فوسفودايستر
فى الأحماض النووية فإن الرابطة التعاونية بين مجموعة الفوسفات ومجموعة 3'-OH فى النيوكليوسيد والتي يحد لها امتداد بين الكربون 3' فى السكر وكربون 5' فى السكر المجاور. وهذه الروابط تكون العمود الفقري للأحماض النووية.

Plaque بلاكى
مساحة رائقة خالية من البكتيريا النامية على بيئة صلبة والناشئة من تحلل الخلايا البكتيرية الناتجة من مهاجمة الفيروس للخلايا البكتيرية وتحتوى هذه المساحة الرائقة على جزيئات فيروسية فقط وأحياناً يستخدم هذا الاصطلاح فى الفيروسات الحيوانية التى تسبب هذه المساحات الرائقة فى طبقات الخلايا الحيوانية النامية على بيئة للزراعة.

Plasmid بلازميد
هو عبارته عن مادة وراثية (DNA) غير كروموسومية والتي لها القدرة على التضاعف بصورة مستقلة عن كروموسوم الخلية العائلة وقد يتواجد فى صورة نسخة واحدة أو عديد من النسخ لكل خلية وأنه يحدث له انغزال إلى الخلايا الشقيقة

أثناء الانقسام الخلوى بطريقة منظمة أو بطريقة عشوائية وبعض البلازميدات مثل العائل F قد تندمج بكموسوم الخلية العائلة.

الطفرة الموضعية Point mutation

هى الطفرة الناشئة عن احلال أو نقص أو اضافة زوج من النيوكليوتيدات.

Poly (A) tail

الذيل عديد نيوكليوتيدات الأدينين

هو الحدوث الطبيعى لإضافة عديد من نيوكليوتيدات الأدينين للطرف 3' من mRNA فى الكائنات حقيقية النواة حيث تحدث هذه الاضافة إلى الطرف 3' من المنسخ الأولى.

Polycistrenic mRNA

الحامض النووى الرسول متعدد السسترونات هو جزيء mRNA والذى يحدث له ترجمة إلى اثنين أو أكثر من أنواع السلاسل الببتيدية والذى يتواجد بصورة أساسية فى الكائنات غير حقيقية النواة.

Poly (d A tail)

الذيل متعدد نيوكليوتيدات الديزوكسى أدينين هو تتابعات من الديزوكسى أدينين والتى يحدث إضافة لها معملياً إلى أحد أو كلا طرفى 3' من خيطى الـDNA مزدوج الخيط ويستخدم فى الهندسة الوراثية لربط جزيئين من الـDNA فى الطريقة المعروفة باسم طريقة وصل الذيل المتجانس.

Polymer بوليمر

هو تنظيم وترتيب الروابط التعاونية لوحداث أساسية لتكوين مركب كبير مثل السلاسل عديدة النيوكليوتيدات أو السلاسل عديدة الببتيد.

Polymerase

إنزيم البوليميز

هو الإنزيم الذى يحفز تكوين روابط تعاونية بين النيوكليوتيدات مثل إنزيم بلمرة الـDNA أو بلمرة الـRNA.

Polymerization start site

موقع بداية البلمرة

هى النيوكليوتيدة فى البروموتور المكملة لأول نيوكليوتيدة فى خيط الـmRNA الذى يحدث له تخليق أو نسخ.

Polynucleotide chain

السلسلة عديدة النيوكليوتيدات

هو جزيء مفرد الخيط يتركب من نيوكليوتيدات ترتبط ببعضها تعاونياً واحدة تلو الأخرى.

Polypeptide

السلسلة عديدة الببتيد

هو جزيء متعدد الوحدات البنائية من الأحماض الأمينية المرتبطة ببعضها عن طريق الروابط الببتيدية.

Polyploidy

التضاعف الكروموسومى

هو الخلية أو الكائن الذى يحتوى على أكثر من مجموعتين كاملتين من الكروموسومات.

Polyribosome (polysome)

عديد الريبوسوم

هو مركب يحتوى على ريبوسوم أو أكثر المرتبطة بجزيء mRNA ما والتى تشترك بنشاط فى تخليق السلسلة عديدة الببتيد.

Polysome

بولى سوم

مجموعة من الريبوسومات المرتبطة بنفس الـmRNA وترجمته.

Positive regulation

التنظيم الموجب

تنظيم التعبير الجينى بواسطة منشط ما والذى يعزز التعبير الجينى عندما يرتبط به.

Preproinsulin بريبروانسولين

هو جزيء الانسولين المخلق في صورته الاولى.

Primary transcript

المنسخ الأولي

نسخه ما من الـ RNA الناتجة من نسخ جين ما وعادة يشير هذا الاصطلاح إلى الجزيء الذي يجب أن يحور ليصبح على صورة جزيء mRNA قابل للترجمة.

Primase إنزيم البريمييز

هو الإنزيم المسئول عن تخليق الـ RNA البادئ لإبتداء تخليق الـ DNA.

Primer البادئ

في الأحماض النووية فإن هذا البادئ هو عبارة عن قطعة صغيرة مفردة الخيط من الـ RNA أو الـ DNA والتي تكون فعالة كنقطة نمو في عملية البلمرة.

Processing

عملية تكوين جزيئات الـ RNA الناضجة

هو مجموعة من التفاعلات الكيميائية والتي فيها يحدث تحويل المنسخ الأولي من الـ RNA إلى الـ mRNA ناضج أو جزيئات من الـ tRNA و الـ rRNA ناضجة.

Prodrug العقار الأولي

هو العقار غير الضار والذي يتحول إلى عقار فعال وظيفياً بواسطة إنزيم خاص.

Proinsulin البروانسولين

هو بادئ الانسولين والذي يحتوى على كل من السلسله A و B بالإضافة للسلسلة عديدة الببتيد التي تصلهما ببعض.

Prokaryote الكائن غير حقيقي النواة

هو أى كائن ينقصه الغلاف النووي والذي فيه لا تنقسم النواة انقساماً ميتوزياً أو ميوزياً مثل البكتيريا والطحالب الزرقاء المخضرة.

Promoter البروموتور

هو ذلك التتابع النيوكليوتيدى من الـ DNA الخاص والذي يرتبط به إنزيمات بلمرة الـ RNA لإبتداء النسخ.

Promoter recognition

التعرف على البروموتور

هو أول خطوة في نسخ الجين.

Pronuclei برونيوكلاي

هى الأنوية المذكورة والمؤنثة الموجودة فى البويضات المخصبة قبل حدوث الاندماج بينهما.

Prophage البروفاج

هو صورة من الفاج (الفيرس) والذي يحدث فيه إدماج للـ DNA الفيرسى بالكروموسوم البكتيرى للخلية العائلة.

Protease إنزيم البروتيز

هو الإنزيم الذى يكسر الروابط الببتيدية فى السلسلة عديدة الببتيد.

Protein البروتين

هو الجزيء الذى يتركب من سلسلة أو أكثر من السلاسل عديدة الببتيد.

Proteome بروتيوم

هو المجموعة الكلية من البروتينات التى توجد شفراتها فى جينوم ما أو هو المجموعة الكلية المتكاملة من البروتينات لكائن ما.

Proto-oncogene بروتوونكوجين

هو الأليل الأصلى نو الطراز البرى للجين المسرطن أو هو الأليل الأصلى غير الطافر من الأليل البرى.

Pseudogene الجين الكاذب

هو ذلك التتابع النيوكليوتيدى من الـDNA والمشابهه بدرجة كبيرة لتلك التتابعات من الـDNA التى تنتج بروتينات فعالة وظيفياً. وهذا الجين الكاذب يرجع اما لحدوث طفرات فى التتابع الشفرى أو الى عدم المقدرة على نسخه وترجمته وبالتالي لا ينتج بروتين فعال وظيفياً ولقد شوهدت الجينات الكاذبة فى جينات الكائنات حقيقية النواة فقط وغالباً ما توجد هذه الجينات فى منطقة كبيرة من الـDNA والتى تحتوى على عديد من التتابعات المتطابقة تقريباً أو المكررة مكونة عائلة جينية ويعتقد أنها طرز طافرة من تتابع نيوكليوتيدى أصلى.

Purines بيورين

هو قسم من القواعد العضوية الموجودة بالأحماض النووية ومن البيورينات الشائعة الأدينين والجوانين.

Pyrimidine بيريميدين

هو قسم من القواعد العضوية الموجودة بالأحماض النووية ومنها الثيمين والسيتوسين واليوراسيل.

Pyrimidine dimmer البريميدين دايمر

قاعدتين من البريميدين المتجاورتين مثل الثيمين المتجاورتين فى نفس خيط عديد النيوكليوتيدات حيث يتكون بينهما روابط كيميائية والذى غالباً ما يحدث عند تعرض الـDNA للأشعة فوق البنفسجية.

Protoplast بروتوبلاست

هى الخلايا النباتية المنفصلة عن بعضها والتى أزيلت جدرها الخلوية.

R

rBST (Recombinant bovine somatotropin)

سوماتروبين بوفين المعاد توليفه

بوفين هرمون النمو المنتج بواسطة كائن آخر.

Recessive allele الأليل المتنحي

هو أليل ما يظهر تأثيره فقط عندما يوجد بصورة متماثلة أو هو الشكل المظهرى الذى يظهر عندما يوجد أليل بصورة متماثلة.

Recombinant cell or individual

الخلية أو المفرد المعاد توليفه وراثياً

هو الخلية أو الفرد الجديد الذى ينشأ نتيجة لحدوث إعادة التوليف للمادة الوراثية.

Recombinant DNA

الـDNA المعاد توليفه

هو عبارة عن جزيء من الـDNA يتركب من قطع من الـDNA مشتقة من جزيئات من الـDNA من مصادر مختلفة.

Recombinant human somatotropin

هرمون السوماتوتروبين الإنسانى المعاد توليفه

هرمون النمو الإنسانى المنتج بواسطة كائن آخر.

Recombinant plasmids

البلازميدات المعاد توليفها

هى البلازميدات التى تحتوى على قطع من الـDNA والذى لا تتواجد أصلاً فى البلازميد وغالباً ما تكون من كائن آخر.

Regulator gene الجين المنظم

هو الجين الذى وظيفته الأساسية تنظيم معدل تخليق ناتج جين آخر أو أكثر من جين آخر.

Release factor عامل التحرر

هو البروتين الذى يتعرف على شفرة توقف الترجمة ويقوم بتحرير السلسلة عديدة الببتيد من على الريبوسوم.

Replacement gene therapy

العلاج الجينى بالإحلال

علاج الفشل الوراثى بإدخال نسخ فعالة وظيفياً من الجين الذى به الفشل الوراثى.

Replication fork شوكة التضاعف

في جزيء الـ DNA الذي يحدث له تضاعف تعتبر شوكة التضاعف هي المنطقة التي يحدث عندها إضافة النيوكليوتيدات لخيوط الـ DNA النامية.

Replication origin منشأ التضاعف

هو ذلك التابع النيوكليوتيدى في الـ DNA الذي يبدأ عنده بداية تخليق الـ DNA الجديد.

Replicon ريبليكون

هو عبارة عن جزيء الـ DNA الذي يحتوى على منشأ التضاعف.

Repressor الكابت

هو البروتين الكابت الذي يمنع نسخ جين ما.

Repressor protein البروتين الكابت

هو ذلك البروتين الذي يرتبط بالـ لاوبريتور المجاور لجين ما ويقفل نسخ هذا الجين.

Restriction endonuclease

إنزيم الاندونيوكليز المحدد

هو الإنزيم الذي يتعرف على تتابع معين من النيوكليوتيدات في الـ DNA ويكسر الـ DNA عند هذا التتابع.

Restriction enzyme إنزيم القطع المحدد

هو طراز من إنزيمات الاندونيوكليز والتي تقطع الـ DNA مزدوج الخيط عند تتابع معين من القواعد والذي يعرف بموقع التعرف أو البالندروم.

Retrovirus رتروفيروس

أحد أقسام الفيروسات الحيوانية التي مادتها الوراثية هي الـ RNA والتي تسبب تخليق الـ DNA مكمل لجينومها من الـ RNA عند مهاجمتها للخلايا العائلة.

Reverse transcriptase إنزيم النسخ العكسى

هو الإنزيم الذي يوجد في الغلاف البروتيني للرتروفيروسات والذي يقوم بتخليق الـ DNA المكمل لخيط الـ RNA القالب.

Ribonuclease إنزيم الريبونوكليز

هو الإنزيم الذي يكسر الرابطة فوسفوديستر في الـ RNA ويرمز بالرمز RNase.

Ribosomal RNA (rRNA)

الحامض النووي الريبوسومى

هو جزيئات الـ RNA الريبوسومية (rRNA) والتي تمثل المكون التركيبى لوحدات الريبوسومات وفي الكائنات حقيقية النواة يوجد أربعة طرز من rRNA وهي 28S, 18S, 5.8S, 5S وبينما في الكائنات غير حقيقية النواة يوجد ثلاثة طرز من الـ rRNA وهي 23S, 16S, 5S.

Ribosome ريبوسوم

هو عضو خلوى يتركب من وحدتين كل وحدة منهما تتركب من البروتين و الـ RNA والتي يحدث بواسطتها ترجمة الـ mRNA إلى أحماض أمينية أثناء تخليق البروتين وفي الكائنات غير حقيقية النواة تكون للوحدتين التي يتركب منها الريبوسوم هي 50S , 30S بينما في الكائنات حقيقية النواة تكون للوحدتين هما 60S , 40S.

Ribosome binding site

موقع الارتباط بالريبوسوم

هو ذلك التابع النيوكليوتيدى في طرف الـ mRNA في الكائنات غير حقيقية النواة والذي يرتبط به الريبوسوم ليبدأ تخليق البروتين ويسمى أيضاً باسم تتابع Shine-Dalgarno.

RNA الحامض النووي الريبوزى

حامض الريبونوكليك والذي يحتوى على السكر الخماسى الريبوز و الـ RNA النمونجى عبارة عن خيط مفرد يحتوى على القواعد النيتروجينية الأربعة وهي الأدينين والجوانين والسيتوسين واليوراسيل.

RNA polymerase إنزيم بلمرة الـ RNA

هو الإنزيم الذى يقوم بنسخ الـ RNA من على الخيط المفرد من الـ DNA.

من تتابعات من النيوكليوتيدات القصيرة والمتكررة
عديد من المرات في الجينوم أو في DNA
الميتوكوندريا أو DNA البلاستيدات الخضراء.

SCID (Severe combined immunodeficiency) نقص المناعة القاسية
نقص المناعة الذي يرجع إلى فقد كل من الخلايا
البائية (B cells) والخلايا التائية (T cells) ويرجع
٢٥% من حالات نقص المناعة القاسية (SCID)
إلى نقص إنزيم أدينوزين دي أميناز (Adenosine
deaminase).

Semiconservative replication

التضاعف نصف المحافظ

هو النظام الطبيعي لتضاعف الـ DNA والذي فيه
يعمل كل خيط من خيطي الـ DNA كقالب لتخليق
خيط جديد مكمل من الـ DNA وعلى ذلك يكون كل
جزء من جزئيات من الـ DNA الشقيقة تتركب
من خيط قديم (أبوي) وخيط آخر جديد.

Sense strand الخيط المعنى

هو خيط الـ DNA الذي يعمل كقالب لنسخ جين ما.

Shine-Dalgarno sequence

تتابع شين دلجارنو

هو ذلك التتابع من الـ DNA الذي يرتبط به
الريبوسوم.

Sigma (δ) subunit الوحدة سigma

هو الوحدة من إنزيم بلمرة الـ RNA التي تتعرف
على البروموتور.

Silencer السيلنسر

من المصطلحات الوراثة التي تشير إلى غلق تعبير
الجين وهو تتابعات من النيوكليوتيدات بالـ DNA
يرتبط بها بروتينات معينة لغلق التعبير الجيني.

Silent mutation الطفرة الساكنة

أي طفرة لا يكون لها تأثير على الشكل المظهري.

RNA polymerase I إنزيم بلمرة الـ RNA
هو إنزيم البلمرة في الكائنات حقيقية النواة الذي يقوم
بنسخ جينات الأحماض النووية الريبوسومية
(rRNAs).

RNA polymerase II إنزيم البلمرة II
هو إنزيم البلمرة في الكائنات حقيقية النواة الذي بنسخ
الجينات التي تحمل شفرات البروتينات.

RNA polymerase III إنزيم البلمرة III
هو إنزيم البلمرة في الكائنات حقيقية النواة الذي بنسخ
جينات الـ tRNA و 5srRNA.

RNA processing

عملية تحويل المنسخ الأولى إلى الـ RNA
هي عملية تحويل المنسخ الأولى إلى mRNA و
rRNA أو إلى tRNA وتشمل عملية الوصل
والكسور وتحويل النهايات وفي حالة الـ tRNA
تتضمن تحويل القواعد الداخلية.

RNA splicing وصل الـ RNA
إزالة الإنترونات وتجميع الإكزونات من المنسخ
الأولى.

Rous sarcoma virus فيروس روس سرcoma
أحد طرز الـ رتروفيروسات التي درست بإستفاضة
ويهاجم الدجاج.

S

Sarcoma سرcoma

هو سرطان ينشأ في خلايا العضلات.

Satellite DNA ساتلايت الـ DNA

هو عبارة عن الـ DNA في الكائنات حقيقية النواة.
والذي يكون حزمة صغيرة (Minor) عند كثافات
مختلفة عن غالبية الـ DNA الخلوي باستخدام الطرد
المركزي في محلول مترن متدرج التركيز ويتركب

Somatic cell الخلية الجسمية
أى خلية فى الكائنات متعددة الخلايا ماعدا
الجاميطات والخلايا التناسلية التى تتكون منها
الجاميطات.

Somatotropin سوماتوتروبين
هو هرمون يتركب من سلسلة عديدة الببتيد والذي
يتحكم فى نمو الخلية والتكاثر فى الإنسان والحيوانات
الأخرى.

Spacer sequence
التتابعات النيوكليوتيدية الفاصلة
هى التتابعات النيوكليوتيدية غير الشفرية الموجودة
بين التتابعات النيوكليوتيدية الشفرية فى جزيء
الـDNA والموجودة بين الجينات.

Species النوع
من الناحية الوراثية هو مجموعة من الكائنات التى
تمتلك القدرة على التزاوج فيما بينها.

Specific transcription factors
عوامل النسخ الخاصة
هى بروتينات منظمة والتى تبدى تأثيرها على جين
مفرد أو اوبرون أو على عدد قليل من الجينات ذات
الصلة.

Splicing factors عوامل الوصل
هى الجزيئات التى تزيل الإنترونات ووصل
الإكزونات من المنسخ الأولى من الـRNA
(hnRNA).

Spontaneous mutation الطفرة التلقائية
هى الطفرة التى تحدث فى غياب أى مادة مطفرة
معروفة.

Src oncogene الجين المسرطن src
هو الجين المسرطن الذى يحمله فيروس
Rous sarcoma والمشتق أصلاً من خلايا الدجاج

80 S ribosome الوحدة الريبوسومية 80 S
الشكل النشط لريبوسومات الكائنات حقيقية النواة
ووحدة 40S ويتركب من وحدة ريبوسومية
60S ريبوسومية.

60 S ribosomal subunit
الوحدة الريبوسومية 60 S
هى الوحدة الريبوسومية الكبيرة التى تدخل فى
تركيب الريبوسوم الكامل فى الكائنات حقيقية النواة.

40 S ribosomal subunit
الوحدة الريبوسومية 40 S
هى الوحدة الريبوسومية الصغيرة فى ريبوسوم
الكائنات غير حقيقية النواة.

70 S ribosome الوحدة الريبوسومية 70 S
فى الكائنات غير حقيقية النواة فإن الجزيء النشط فى
تخليق البروتين يتركب من وحدتين هما 30S و50S
واللتان يتركب منهما الريبوسوم الكامل 70S.

50 S ribosomal subunit
الوحدة الريبوسومية 50 S
هى الوحدة الريبوسومية الكبيرة فى ريبوسوم
الكائنات حقيقية النواة.

30 S ribosomal subunit
الوحدة الريبوسومية 30 S
هى الوحدة الريبوسومية الصغيرة التى تدخل فى
تركيب الريبوسوم فى الكائنات غير حقيقية النواة.

Start codon شفرة البداية
هى شفره فى الـmRNA ذات التتابع AUG حيث
يحدث عندها ابتداء تخليق السلسلة عديدة الببتيد.

Stem cell الخلية الجذعية
هى الخلية البادئة التى تعطى خلايا خاصة ذات طرز
مختلفة وكذلك مزيد من الخلايا الجذعية.

Steroid **استرويد**
 طراز من جزيء البوليسيسليك ليوبوفليك والذي
 يحتوى على الكولسترول وهو هرمون الجنس.
Steroid hormones **هرمونات الاسترويد**
 هي هرمونات الاسترويد مثل هرمونات الجنس.
Steroid receptor **مستقبل الاسترويد**
 هو بروتين مزدوج الوظيفة والذي يعمل كمستقبل
 لهرمون الاسترويد وكعامل نسخ.
Stop codon **شفرة التوقف**
 هي واحدة من الشفرات الثلاثة UAA أو UAG
 أو UGA في جزيء mRNA والتي يتوقف
 عندها تخليق السلسلة عديدة الببتيد.
Structural gene **الجين التركيبى**
 هو الجين الذى يحمل تتابع شفرات الأحماض الأمينية
 لسلسلة عديدة الببتيد ما.

T

TATA box **الصندوق TATA**
 هو تتابع القواعد فى بروجينوتور الكائنات حقيقية النواة
 والذي يرتبط به إنزيم بلمرة RNA وأحياناً يسمى
 باسم Hogness box ويشير الحرف T و A لكل
 من قاعدة الثيمين والأدينين على التوالى.
T cells **الخلايا التائية**
 هي خلايا النظام المناعى التى تزيل الخلايا المعدية
 بالفيروس وتفرز عوامل ذائبة تنشط خلايا أخرى فى
 النظام المناعى وخاصة الخلايا البائية (B cells)
 ومسئولة عن صناعة مستقبلات الخلايا التائية أكثر
 منه صناعة الأجسام المضادة.
Telomerase **إنزيم التلوميريز**
 الإنزيم الذى يصنع الـ RNA بالإضافة للبروتين
 والذي يعيد إطالة التلوميرات بإضافة الـ DNA إلى
 طرف كروموسوم ما فى الكائنات حقيقية النواة.

Telomere **التلومير**
 هو الكروموميرات الطرفية لكروموسوم ما وهو
 عبارة عن تتابع من الـ DNA الذى يتطلبه ثبات
 أطراف الكروموسوم.
Template **القالب**
 هو خيط الـ DNA الذى يستخدم كقالب لتخليق
 خيط جديد عن طريق الاقتران بين أزواج القواعد
 المكملة.
Template strand **الخيط المطبوع**
 هو خيط الحامض النووى الذى ينسخ من تفاعل
 البلمرة.
Terminal nucleotidyl transferase
 إنزيم النيوكليوتيديل ترانسفيريز الطرفى
 هو الإنزيم الذى يضيف النيوكليوتيدات إلى الطرف
 3' لأحد خيطى الـ DNA مزدوج الخيط والمستخدم
 فى الهندسة الوراثية لتكوين أطراف متماثلة فى
 خيطى الـ DNA.
Tet O operator **أوبريتور التت (Tet O)**
 هو موقع فى مقدمة لوبرون التت (tet operon)
 حيث يرتبط به البروتين الكابت.
Tet operon **أوبرون التت (Tet)**
 مجموعة الجينات البكتيرية المتجمعة والتي تشجع
 المقاومة للمضاد الحيوى التتراسيكلين.
Tetracyclines **التتراسيكلينات**
 عائلة من المضادات الحيوية ذات أربعة حلقات
 مندمجة مشتقة من الممر بولى كيتيد
 (Polyketide).
Tet R repressor **الكابت Tet R**
 هو البروتين الكابت الذى ينظم عمل لوبرون التت
 (Tet operon).
Therapeutic cloning **الكلونة العلاجية**
 هي الكلونة للحصول على نسيج لإعادة زراعته
 بعكس توليد فرد جديد.

Thyroid hormone هرمون الثيرويد

هو الهرمون الذي يصنع بواسطة الغدة الدرقية.

Toxin توكسين

جزء سام وغالباً ما يكون بروتين ذو منشأ بيولوجي وخصوصاً يشير هذا المصطلح إلى البروتينات التي تصنعها البكتيريا المُمرضة.

Trans configuration الشكل التنافرى

هو ترتيب الجينات المرتبطة والذي يكون فيه الفرد الخليط في موقعين طفرين حيث حصل على أحد الموقعين الطفرين من أحد الأبوين والموقع الطفرى الآخر من الأب الآخر مثل $a^1+/- +a^2$.

Transcription النسخ

هى العملية التي تنسخ فيها المعلومات الموجودة في الخيط القالب من الـDNA في صورة خيط مفرد من الـRNA حيث يكون ترتيب القواعد مكمل لتلك الموجودة في خيط الـDNA القالب.

Transcription bubble انبعاث النسخ

هى المنطقة من الـDNA والتي يحدث عندها فتح الحلزون المزدوج من الـDNA بصورة مؤقتة بما يسمح بحدوث النسخ.

Transcription factor عامل النسخ

هو البروتين الذي ينظم التعبير الجينى عن طريق ارتباطه بالـDNA عند منطقة التحكم من الجين.

Transcription start site موقع بداية النسخ

هى نقطة البداية والتي يبدأ عندها تحويل جين ما إلى نسخة من الـRNA.

Transcriptome ترانسكربتوم

المجمع الكلى من الـRNA المنسوخة الموجودة بخلية ما تحت مجموعة خاصة من الظروف.

Transformation التحول

هو تحول التركيب الجينى للبكتيريا بتعرضها للـDNA المعزول من بكتيريا أخرى ذات تركيب جينى مختلف.

Transgene الجين المنقول

هو الجين الأجنبي الذي يحدث له إدماج فى كائن ما باستخدام الهندسة الوراثية.

Transgenic الترانسجينيك

هو كائن ما به قطعة أجنبية من الـDNA حدث له إدماج ثابت بجينومه.

Transgenic plant النبات المعدل وراثياً

هو النبات الذى يحتوى على الجين المنقول من نبات آخر مختلف أو من كائن آخر.

Translation الترجمة

صناعة أو تخليق البروتين باستخدام المعلومات المقدمة بواسطة الـmRNA.

Translatome الترانسلاتوم

مجموعة البروتينات الكلية التي ترجمت بالفعل والتي تتواجد بخلية ما تحت مجموعة معينة من الظروف.

Transposable element العامل المتنقل

هو ذلك التتابع النيوكليوتيدى من الـDNA القادر على الحركة والتنقل من موقع إلى آخر داخل الجينوم.

Transposase إنزيم الترانسبوساز

هو الإنزيم المسئول عن حركة وتنقل الترانسبوزون.

Trehalase إنزيم التريهالاز

هو الإنزيم الذى يكسر سكر التريهالوز إلى جزئين من سكر الجلوكوز.

Terhalose سكر التريهالوز
هو سكر مخزن غير مختزل في النبات والذي يحمى
النبات ضد فقد الماء.

Trehalase-6-phosphate phosphatase
إنزيم تريهالاز-6-فوسفات فوسفاتيز
هو الإنزيم الذي يزيل الفوسفات من التريهالوز-
6-فوسفات.

Triplet codon الشفرة الثلاثية
هى الشفرة التى تتركب من تابع معين من ثلاثة
قواعد تعبر عن حاض أمينى معين.

tRNA الحامض النووى الناقل
هو جزيء صغير من الـRNA الذى يقوم بترجمة
الشفرة فى الـmRNA إلى أحماض أمينية أثناء
تخليق البروتين ويحتوى على تتابع من ثلاثة قواعد
تعرف بالشفرة المضادة والمكملة بشفرة خاصة فى
جزيء الـmRNA عند الموقع الذى يحدث عنده
ارتباط حامض أمينى معين او من أى مصدر اخر.

Tumor-suppressor gene الجين الكابت للورم
هو الجين الذى يعمل على منع الانقسام الخلوى
غير المرغوب ويسمى أيضاً بالجين المسرطن
المضاد (Anti-oncogene).

U

Uncharged tRNA الحامض النووى الناقل غير المحمل
هو جزيء الـtRNA الذى لا يحمل أى حامض
أمينى.

Unique-sequence DNA التتابعات النيوكليوتيدية الفريدة
هو ذلك التتابع النيوكليوتيدى الذى يحدث فقط
بصورة مفردة فى الجينوم الأحادى بالمقارنة
بالتتابعات النيوكليوتيدية المتكررة.

Universal genetic code عمومية الشفرة الوراثية
ثبات وعمومية الشفرة الوراثية للأحماض الأمينية
المختلفة فى كل الكائنات.

V

Vector الحامل
فى الهندسة الوراثية هو عبارة عن جزيء من
الـDNA القادر على التضاعف ويستخدم كحامل
لجزيء الـDNA أو قطعة من الـDNA
ويسمى بحامل الكلونة ومن هذه الحاملات
البلازميدات البكتيرية وجزيئات الـDNA
الفيروسية.

Virion فيروس
جزيء الفيروس فى الحالة الحرة وقبل تطفله على
الخلية العائلة.

W

Wobble الترنج
هو الاقتران البديل لعدد من القواعد بقاعدة معينة
فى الموقع الثالث من الشفرة فى عملية الاقتران
بين الشفرة والشفرة المضادة.

Wild type الطراز البرى
هو الشكل المظهرى أو التركيب الجينى الشائع فى
العشيرة الطبيعية.

هذا الكتاب

يعتبر أحد الكتب الرائدة فى مجال البيولوجيا الجزيئية الصادرة باللغة العربية وهو يفيد الدارسين والباحثين فى مجالات التقنية الحيوية والزراعة والطب والصيدلة والعلوم لتكوين خلفية جيدة عن الجينات وتطبيقات الهندسة الوراثية.

من المواضيع الاساسية التى يتناولها هذا الكتاب:

- الطبيعة الكيميائية للجينات
- الشفرة الوراثية والتخليق الحيوى للبروتين
- الطبيعة الكيميائية للتعبير الجينى
- تنظيم التعبير الجينى فى الكائنات حقيقيّة النواة وغير حقيقيّة النواة
- كما يشرح العديد من التطبيقات الحديثة فى الهندسة الوراثية مع الاستعانة بالرسومات التوضيحية، ومن تلك التطبيقات:
- « النباتات والحيوانات المعدلة جينياً
- « الأستنساح
- « العلاج الجيني
- « البيولوجيا الجزيئية للسرطان

ويمتيز هذا الكتاب فى نهايته بوجود مسرد (Glossary) للمصطلحات الواردة به باللغتين الانجليزية والعربية مع شرحها ليسهل للقارئ المراجع الأجنبية الحديثة وشبكة الانترنت

المؤلف

Bibliotheca Alexandrina



1212771

ISBN 978-977-396-137-4



9 789773 961374

رقم الإيداع 2013/15821

